

N^o D'ORDRE
79

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Madame LESBROS

Née Marguerite VUGIER

1^{re} THÈSE. - Accoutumance et Anaphylaxie chez les Microbes.

2^e THÈSE. - Propositions données par la Faculté.

Soutenue en Novembre 1927 devant la Commission d'examen.

MM. H. CARDOT

J. BEAUVÉRIE

F. ROMAN

LYON

IMPRIMERIE LÉON SÉZANNE

75, rue de la Buire, 75

1927

ACCOUTUMANCE ET ANAPHYLAXIE
CHEZ LES MICROBES

TRAVAUX ANTÉRIEURS

M^{me} LESBROS-MONTOLOY
(en collaboration avec Auguste LUMIÈRE)

Infection et immunisation charbonneuses par voie péritonéale. (C. R. Ac. des Sc., t. 182, 1926, p. 594.)

Sur la formation des abcès de fixation. (C. R. Ac. des Sc., t. 183, 1926, p. 812.)

Mode d'action de l'autohémothérapie. (C. R. Ac. des Sc., t. 184, 1927, p. 1136.)

Sur la flore microbienne des tumeurs malignes. (Bull. Ac. de Méd., t. 97, 1927, p. 767.)

Les injections septiques. (Lyon Chirurgical, sept.-oct. 1927.)

N^o D'ORDRE
79

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Madame LESBROS

Née Marguerite VUGIER

1^{re} THÈSE. - Accoutumance et Anaphylaxie chez les Microbes.

2^e THÈSE. - Propositions données par la Faculté.

Soutenue en Novembre 1927 devant la Commission d'examen.

MM. H. CARDOT
J. BEAUVERIE
F. ROMAN

LYON
IMPRIMERIE LÉON SÉZANNE
75, rue de la Buire, 75

1927

UNIVERSITÉ DE LYON - FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. DEPÉRET, *, O., Q I., ✕, Membre de l'Institut.

Assesseur

M. KOEHLER, * O., Q I., ✕, Correspondant de l'Institut.

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, * O., Q I. — R. DUBOIS, *, Q I., ✕.

GÉRARD, * O., Q I., ✕ C. — RIGOLLOT, *, Q I. — VAUTIER, Q I. —

LE VAVASSEUR, *. Q I. — OFFRET.

Professeurs titulaires

MM. DEPÉRET, * O., Q I., ✕, Membr de l'Institut, *Géologie*.

KOEHLER, *, Q I., ✕, Correspondant de l'Institut, *Zoologie*.

X..., *Minéralogie théorique et appliquée*.

DULAG, *, Q I., *Calcul différentiel et intégral*.

MASCARD, *, Q I., ✕, *Astronomie physique*.

GRIGNARD, * O., Q I., ✕, P. N., Membre de l'Institut, *Chimie générale*.

SIRE, Q A., *Mécanique rationnelle et appliquée*.

CARDOT, *Physiologie générale et comparée*.

MEUNIER, *, Q I., *Chimie industrielle*.

COUTURIER, Q I., ✕, *Chimie agricole*.

BEAUVIERE, *, Q I., ✕ C., *Botanique*.

TROVERT, *, Q I., ✕, *Physique*.

VANEY, *, Q I., *Zoologie*.



Professeurs titulaires (sans chaire)

MM. LOCQUIN, *, Q I., *Chimie générale*.

H. DOUIN, *Botanique*.

DÉJARDIN, *Physique*.

JOB, Q I., *Chimie physique*.

Maîtres de conférences et Chargés de cours complémentaires

MM. LEMARCHANDS, O., I., *Chimie industrielle*.

RICHE, Q I., *Géologie*.

BONNET, Q I., *Zoologie appliquée et Zootechnie*.

ROMAN (F.), Q J., *Géologie agricole*.

MAYET, *, Q I., *Anthropologie*.

PELOSSE, Q A., *Sériciculture*.

CLÉMENT, Q I., ✕, *Physiologie*.

DONCIEUX, Q I., *P. C. N. supérieur*.

SEYEWETZ, *, Q I., *Matières colorantes artificielles*.

EYRAUD, *Mathématiques générales*.

Secrétaire

M^{me} NÉTIEN, Q A.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A. M. AUGUSTE LUMIERE

Membre correspondant de l'Académie de Médecine.

Nous gardons le souvenir agréable de quatre années de travail passées dans son laboratoire. — Son enseignement et ses conseils de chaque jour nous ont été précieux. — Sa bonté pour nous ne s'est jamais démentie en toutes circonstances. Nous sommes heureuse de lui renouveler, ici, l'assurance de notre profonde gratitude et de notre respectueux attachement.

A MES MAÎTRES DE L'INSTITUT PASTEUR

M. LE PROFESSEUR CALMETTE

M. LE PROFESSEUR BESREDKA

M. LE DOCTEUR WOLMAN

A MES PROFESSEURS DE LA FACULTE DES
SCIENCES DE PARIS

A MES PROFESSEURS DE LA FACULTE DES
SCIENCES DE LYON



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

On sait que les microbes, placés dans un milieu contenant en solution des substances toxiques minérales ou organiques, sont capables, dans une certaine mesure, de s'accoutumer à ces nouvelles conditions et de se reproduire en présence de ce poison.

Toute accoutumance suppose l'acquisition d'une propriété nouvelle, d'une réaction de défense, car l'accoutumance est la conservation de la vie et de ses manifestations dans des conditions anormales; elle ne pourra donc s'établir chez un organisme que si ses propriétés de réaction restent toujours supérieures aux conditions extérieures : propriétés préexistant lors de la première rencontre de l'être avec le poison, propriétés s'accroissant et se perfectionnant sans cesse à chaque nouvelle rencontre. Qu'à un moment ou à un autre l'activité de la cellule baisse par suite de mauvaises conditions de culture ou de vieillissement, que la première dose de toxique ou l'une des doses suivantes dépasse une certaine limite, ce sera pour la cellule le bouleversement de son architecture colloïdale et la mort. Par contre, si la dose de toxique ne dépasse pas la limite compatible avec les réactions de la cellule, celle-ci adapte à nouveau ses

échanges avec le milieu extérieur, rétablit un équilibre momentanément compromis et continue à vivre et à se reproduire, prête dès lors à subir une nouvelle attaque plus puissante. Accoutumée, elle en triomphera aisément.

Mais il arrive aussi (et cela a été observé surtout chez les animaux supérieurs) qu'il se produit un phénomène inverse de celui de l'accoutumance. Une seule dose de substance, quelquefois même nullement toxique par elle-même, suffit à conférer à l'organisme, aux cellules ou aux humeurs, en un mot aux colloïdes de l'organisme, une hyper-sensibilité remarquable. A tel point qu'une nouvelle dose, quelquefois inférieure à la dose première, suffit à entraîner la mort.

Il nous a paru intéressant de rechercher quelles peuvent être les lois générales qui gouvernent ces phénomènes et règlent l'établissement de l'accoutumance ou l'apparition de l'hyper-sensibilité chez les microbes; il est bien entendu que ces phénomènes et les lois qui les régissent peuvent être tout différents chez les microbes et chez les animaux supérieurs.

Un grand nombre d'expérimentateurs ont abordé le problème, avec l'espoir de trouver dans sa solution un moyen pratique d'étudier l'hérédité cellulaire. Il ne semble malheureusement pas que leurs résultats aient été toujours concordants. Cela s'explique assez facilement, car la technique à utiliser dans ce genre de recherches est assez délicate et exige une précision absolue dans ses moindres détails. Il suffit qu'elle varie légèrement d'un observateur à un autre pour que l'on constate aussitôt une discordance entre les résultats. La pre-

mière précaution à prendre par nous était donc, éclairée par les travaux de nos devanciers, d'éliminer dans toute la mesure du possible la plus légère cause d'erreur, de ne rien négliger pour établir une technique susceptible de nous donner dans des conditions semblables des résultats constants (1).

En possession d'une méthode expérimentale qui paraît nous donner toute sécurité, nous essaierons, au cours de ce travail, de répondre aux questions suivantes :

1° Les microbes peuvent-ils s'accoutumer aux toxiques et dans quelle mesure ?

2° L'accoutumance des microbes aux toxiques est-elle un fait d'ordre général ? C'est-à-dire les microbes s'accoutument-ils à tous les poisons, et tous les microbes sont-ils capables de s'accoutumer ?

3° Dans quelles conditions et suivant quelles lois cette accoutumance peut-elle s'établir ?

4° Etant accoutumés, les microbes peuvent-ils se transmettre par hérédité la propriété de vivre sur le milieu toxique ; ou, au contraire, les nouvelles générations sont-elles plus sensibles au poison ?

5° Peut-on observer soit directement, soit par voie héréditaire, le phénomène inverse de l'accoutumance, c'est-à-dire l'hyper-sensibilité ou l'anaphylaxie ?

Dans ce travail purement expérimental, nous exposons les faits tels que nous les avons observés, mais nous nous abstenons de formuler toute hypothèse sur le mécanisme intime du phénomène de l'accoutumance.

(1) Voir Annales I P-1923-24.

HISTORIQUE

Les premiers travaux sur l'accoutumance des microbes aux poisons remontent à 1887. A cette date paraît le travail de KOSSIAKOFF, intitulé : « De la propriété que possèdent les microbes de s'accommoder aux milieux antiseptiques ». Déjà, dans cet article, on trouve posés tous les problèmes que les bactériologistes ont essayé de résoudre par la suite.

« Pour nous en tenir à l'action des antiseptiques : un microbe qui sort d'un milieu antiseptisé, est-il plus ou moins disposé à vivre ou à se multiplier dans un nouveau milieu identique au premier, qu'un microbe qui sort d'un bouillon très nutritif et très favorable ? Si on songe que la présence de l'antiseptique crée évidemment une situation fâcheuse pour le développement et l'évolution, que le microbe sort affaibli de ce milieu, on conclura qu'il est moins bien outillé qu'un microbe en pleine santé pour supporter la nouvelle existence pénible qu'on va lui imposer; et par conséquent pour lui permettre de vivre, il faudra lui diminuer la dose d'antiseptique. Si l'on attribue, d'autre part, quelque importance à cette flexibilité de tout organisme vivant, et à cette influence de l'hérédité qui forme le fond de la doc-

trine de M. DUCLAUX, « Le microbe et la maladie », on sera, au contraire, disposé à penser que le microbe qui sort du milieu antiseptique est acclimaté en partie dans ce milieu du moment qu'il y a vécu, qu'il est, par conséquent, mieux disposé qu'un microbe neuf, même bien portant, même mieux portant que lui, à y vivre de nouveau et que ses descendants, non seulement redouteront moins que leurs congénères non acclimatés, la dose d'antiseptique dans laquelle ont vécu leurs parents, mais pourront en supporter des doses plus considérables.

« Quelle que soit, du reste, l'interprétation des résultats, la question est bonne à poser. Elle peut fournir l'explication d'un certain nombre de contradictions ou d'échecs constatés dans l'étude des antiseptiques, et, dans un ordre d'idées plus élevé mais plus délicat, servir à faire comprendre comment certaines médications antiseptiques, très actives à l'origine, sur un individu ou sur un ensemble d'individus, peuvent devenir plus ou moins actives et même rester inertes. »

On trouve également dans ce travail les précautions nécessaires pour éviter les défauts de technique troublant la régularité des résultats : préparation de grandes réserves de bouillon, ensemencement avec une quantité de semence égale et très petite, exposition à une même température des tubes d'une même expérience.

L'auteur fait remarquer que tous les antiseptiques ne se comportent pas de la même façon; le bichlorure de mercure, par exemple, peut être variable dans ses manifestations sur les microbes. Ce fait provient à son avis, de ce que le sublimé détermine, en se combinant aux matières albuminoïdes du bouillon, un précipité qui se

dépose; il est donc difficile de savoir exactement ce qui reste en solution car les doses employées sont très faibles $1/40.000$ — $1/36.000$.

Il importe également de prendre des précautions pour l'ensemencement, la même précipitation peut se faire avec les protéiques des microbes, ce qui, alors, diminue de façon variable le nombre de germes dans les divers ballons.

Les conclusions de l'ouvrage établissent, pour des doses croissantes de borax, d'acide borique, de bichlorure de mercure, l'accoutumance des microorganismes suivants : bacillus subtilis et anthracis — tyrothrix scaber et tenuis — bacteridie charbonneuse. La valeur de l'accoutumance est différente pour chacun d'entre eux.

A la suite, de nouvelles publications sont venues enrichir la question. HAFKINE adapte des infusoires et des bactéries à des milieux différents. SOREL publie un mémoire sur l'accoutumance de la levure à l'acide fluorhydrique. EFFRONT accoutume des levures à l'acide fluorhydrique et aux fluorures. FRANK Daniel opère sur des paramoécies qu'il adapte à l'alcool et à l'eau distillée. BEYERINK étudie les variations du *b. prodigiosus*. Hans REGENSTEIN cultive différents microbes sur des milieux contenant du sublimé et du phénol. THAYSEN accoutume des microbes à faire fermenter les hydrates de carbone. SENAI AKATSU et HIDEYO NOGUGHY utilisent les spirochètes. GORINI les ferments lactiques. EULER-LAURIN, PETTERSON accoutument des levures au galactose. MORGENROTH recherche la résistance acquise aux médicaments par des pneumocoques.

Il faut relater encore les expériences de REVICI culti-

vant la bactérie charbonneuse dans les milieux arsenicaux; celles de GRASSBERGER sur l'adaptation et l'hérédité chez les bactéries et celles de MASSINI qui étudie les variations au sens de DE VRIES.

Dans le même ordre d'idées, il nous faut signaler également les travaux de REICHENBACH, MADSEN et NEYMAN, PAUL et KRONIG.

Mais il faut s'adresser à RICHET et à ses élèves pour trouver la contribution et l'apport le plus important sur le sujet. Ces auteurs ont étudié tout spécialement une bactérie : le ferment lactique et un certain nombre de corps : sels métalliques et organiques, toxiques et non toxiques, parmi lesquels nous notons le nitrate de thallium, l'arséniate et le bromure de potassium, les sels de vanadium et de zinc, le chlorure de sodium, le bichlorure de mercure et le sulfate de cuivre, le saccharose et le phénol.

Les travaux de RICHET sur l'influence de substances toxiques ou non toxiques sur la fermentation du bacille lactique remontent à 1878. Mais c'est seulement en 1914, que deux ouvrages sur l'accoutumance du ferment lactique aux poisons ouvrent la série des recherches de cet auteur dans cette voie.

Dans ses premiers essais, RICHET utilise un milieu de culture composé de lait, additionné d'un égal volume d'eau distillée. Il constate une accoutumance pour les poisons qui s'établit rapidement en quatre, cinq ou huit jours. Le maximum atteint pour chaque poison est variable suivant la concentration initiale. Pour chaque degré de concentration de l'antiseptique il se fait une nouvelle accoutumance. Les propriétés acquises par le fer-

ment accoutumé se perdent très vite; il suffit de vingt-quatre heures pour que le microbe remis sur lait normal ait retrouvé intégralement ses fonctions ordinaires.

RICHET conclue donc que la cellule vivante possède une plasticité remarquable qui lui permet de s'adapter avec facilité à un milieu nouveau, et de modifier ses réactions dans le sens qui est favorable au bon équilibre de ses fonctions.

RICHET, qui a démontré que l'accoutumance se fait pour un grand nombre de toxiques, est cependant frappé par un fait singulier : il constate que certains corps agissent toujours de la même façon sur les microbes, quelles que soient les conditions de l'emploi, alors que d'autres corps donnent des résultats très variables. Il cite, dans cette dernière catégorie, le bichlorure de mercure et le sulfate de cuivre auxquels les ferments lactiques n'ont jamais pu s'accoutumer.

Plus tard, avec l'aide de ses collaborateurs, M. Henry CARDOT, M^{lle} BACHRACH et M. H. LAUGIER, il étudie plus en détail les modalités de l'accoutumance. Ces auteurs mettent en lumière que l'accoutumance ne s'établit pas graduellement dans tous les cas. Elle apparaît brusquement pour certains tubes de culture, alors que, pour d'autres tubes de la même expérience, l'accroissement de végétation est moins rapide. C'est un phénomène comparable à celui des mutations brusques de DE VRIES.

L'accoutumance est spécifique pour un toxique donné, mais elle peut être obtenue pour plusieurs toxiques à la fois : soit que les toxines aient été employées simultanément ou alternativement.

Les ferments accoutumés ont acquis des propriétés

nouvelles qui se transmettent par hérédité à leur descendance; c'est en quelque sorte la création d'une race, capable de vivre sur un milieu défavorable.

Cependant le microbe accoutumé devient beaucoup plus fragile et supporte mal les fortes doses de poisons; une légère modification du milieu de culture suffit pour le faire mourir et la dose de poison qu'un ferment normal peut supporter est mortelle pour le ferment accoutumé.

Il nous reste encore à mentionner que dans certains cas les microbes accoutumés, maintenus dans leur milieu toxique, perdent leurs propriétés de microbes accoutumés, deviennent plus sensibles à l'action de l'antiseptique et meurent après quelques passages. Ce phénomène, sur lequel nous aurons l'occasion de revenir plus longuement, a été assimilé par les auteurs à une sorte d'anaphylaxie.

MÉTHODES

Dans l'étude d'un antiseptique il entre en jeu un certain nombre d'influences que nous nous proposons de mettre au point en premier lieu, avant d'aborder le problème de l'accoutumance et de l'anaphylaxie.

Il nous faut envisager successivement la nature et l'origine du microbe sur lequel on opère, la quantité de semence, son âge; la composition du milieu de culture, ses variations d'acidité et d'alcalinité. Il nous faudra étudier également la température et la durée de l'expérience.

En tenant compte de ces considérations, nous avons essayé d'établir une méthode de travail donnant dans les mêmes conditions des résultats constants. Après des tâtonnements, nous sommes arrivée à obtenir une végétation égale, dosée par une même mesure dans tous les tubes d'une même expérience. Pour obtenir ce résultat, nous avons dû nous astreindre à observer les précautions suivantes :

1° CHOIX DES MICROBES

Nos expériences ont porté plus spécialement sur le ferment lactique pour des raisons de commodité dans les

dosages. Néanmoins nous avons cru bon, à plusieurs reprises, de compléter nos recherches par des études sur d'autres microbes : bacilles coli, bacilles diphtériques, staphylocoques, levures.

Quatre souches, 1, 2, 3 et R de ferments lactiques, conservées au Laboratoire de biologie de M. Auguste LUMIÈRE, ont servi à nos expériences. Notre ferment se présente sous la forme d'un cocco bacille, ne prenant pas le Gram, se groupant en courtes chaînettes de 2, 3 ou 4 éléments, proliférant très rapidement. Sur le milieu que nous utilisons, les tubes de culture présentent un trouble uniforme, dès la cinquième ou sixième heure. Le développement est optimum à la température de 37°, il suffit d'amener en temps opportun les tubes à l'ébullition pour en détruire complètement tous les éléments vivants.

2° CHOIX DU MILIEU DE CULTURE

La composition du milieu de culture a nécessité une série de recherches avant que nous obtenions toutes les conditions requises. Il nous fallait une fermentation rapide, un bon rendement en acide lactique et surtout *une égale répartition des germes en tous points de la culture pendant toute la durée de l'expérience*. Craignant que l'emploi des milieux organiques habituels, à composition chimique presque complètement inconnue et souvent variable, n'introduise dans nos recherches une cause d'erreur ou d'inconstance, nous nous sommes adressée tout d'abord à des milieux minéraux chimiquement définis. Le liquide de Raulin nous a donné des cultures trop mai-

gres pour que de grosses modifications d'acidité puissent être appréciées sans erreur notable. Si nous mesurons l'acidité vraie en cc. de solution potassique à 2 % nous voyons qu'elle est égale pour les tubes de culture à 1 cc. 8. Par contre, nous avons obtenu sur le liquide de Mazé une prolifération abondante; malheureusement, la précipitation du carbonate de calcium nous gênait et empêchait que les résultats des dosages soient constants dans une même série de recherches; nous avons essayé une culture sur ce milieu modifié, le précipité étant éliminé par filtration; mais l'acidité n'était plus mesurée que par un chiffre très faible. Egalement un autre milieu, dérivé du liquide de Cohn, ne nous a pas paru présenter d'avantages assez importants pour être employé. Il nous a donc fallu revenir aux milieux organiques.

Nous avons cru pouvoir nous arrêter au milieu suivant : à du petit lait stérilisé une première fois à 110° pendant 20 minutes pour précipiter les albumines coagulables par la chaleur, puis filtré sur papier, on ajoute du bouillon Liebig primitivement chauffé 20 minutes à 120° dans la proportion d'une partie de bouillon pour trois parties de petit lait

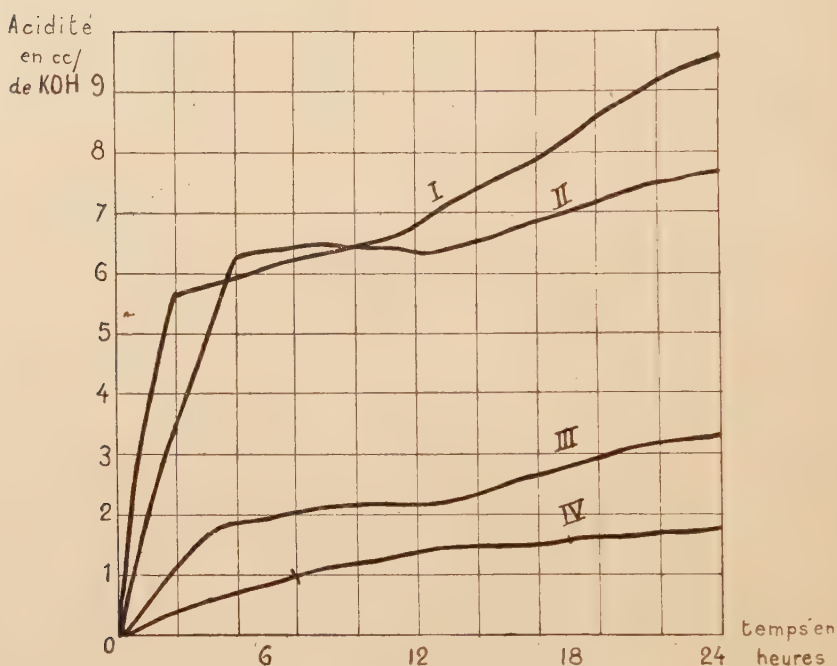
Bouillon Liebig :

Eau distillée	1.000 cc.
Extrait Liebig	5 gr.
Peptone	20 gr.
NA CL	5 gr.

Le mélange est additionné de lactose à la dose de 30 gr. par litre, puis il est neutralisé aussi exactement que possible au moyen d'une solution de potasse en présence de

phénol phtaléine. La répartition se fait dans des tubes de même forme et de même calibre, à raison de 10 cm. par tube, à l'aide d'une pipette graduée.

Graphique I



Etude du rendement en acide lactique des quatre milieux étudiés :

- I. — Bouillon de petit lait lactosé.
- II. — Milieu de Mazé modifié.
- III. — Milieu de Mazé.
- IV. — Milieu de Cohn.

L'évaluation en est faite par la mesure de la quantité d'acide lactique formé, avec une solution de KOH 2 ‰.

Les cultures de ferment lactique sur ces milieux sont restées vingt-quatre heures à l'étuve.

Le milieu que nous avons utilisé finalement (bouillon de petit lait lactosé) est facile à préparer et présente le grand avantage d'être toujours à peu près constant dans sa composition. Il suffit, en effet, de stériliser une assez grande quantité du même petit lait, seul élément du mélange susceptible de varier dans une mesure appréciable. Les fermentations lactiques obtenues sur cette préparation sont d'une rigoureuse similitude. Voici quelques chiffres des dosages d'acidité, résultats d'une quelconque de nos expériences où tous les tubes ont été soumis au même traitement.

Sur 100 tubes, 92 ont donné une acidité mesurée par 8 cc. 6 de solution de KOH à 2 0/00 (ce qui correspond à 0 gr. 027 d'acide lactique); pour 2 autres tubes, l'acidité égalait 8 cc. 8 et, pour les 6 derniers, elle était de 8 cc. 5. La variation relative est seulement de l'ordre de 3/1000.

COMPOSITION CHIMIQUE DU MILIEU

Nous trouvons dans le traité de microbiologie de DUCLAUX que de légères variations d'alcalinité ou d'acidité suffisent pour modifier les résultats d'expériences. Cet auteur fait remarquer qu'une addition d'acide, en petite quantité dans le milieu, augmente notablement les propriétés antiseptiques du bichlorure de mercure et du salicylate de soude. Pour ce dernier antiseptique, ce point a une application pratique dans la fabrication des vins.

Il était donc nécessaire d'avoir toujours une acidité initiale des milieux de culture bien définie, si nous voulions que nos résultats soient toujours comparables.

M^{re} BACHRACH et M. CARDOT ont déterminé, pour le ferment lactique, l'acidité initiale favorable au meilleur

rendement de la fermentation. Leurs expériences ont porté sur une série d'acidités allant de la neutralité à une acidité de 0,1 N. Leurs résultats réalisent une courbe en cloche dont le point optimum correspond à un Ph voisin de 4,5. Pour un ferment lactique déterminé et un milieu constant, le point optimum ne varie ni avec l'acide (soit que ces auteurs emploient l'acide azotique ou l'acide lactique) ni avec le temps de fermentation.

Nos essais personnels nous ont amené à choisir comme point optimum une neutralité aussi exacte que possible à la phénol-phtaléine.

3° ADDITION DE LA SUBSTANCE TOXIQUE AUX MILIEUX

L'addition de certains toxiques, certains sels de métaux lourds (bichlorure de Hg, nitrate d'argent, sulfate de cuivre) détermine, dans les milieux de culture contenant des substances organiques, la formation d'un précipité. Ce précipité, en se ramassant, englobe les microbes et fausse les résultats d'expérience. Pour éviter cette cause d'erreur nous avons procédé de la façon suivante :

a) *Préparation de l'antiseptique.*

Nous faisons dans de l'eau stérile une solution très concentrée qui n'avait donc pas besoin d'être portée à l'autoclave; avec cette solution mère nous pouvions obtenir ensuite des solutions plus diluées dans de l'eau stérile.

b) *Addition de l'antiseptique au bouillon.*

Dans un ballon contenant 500 cc. de bouillon, nous ajoutions la dose déterminée de toxique, nous agitions pendant quelques minutes pour éviter les précipitations massives, mais en ayant soin de ne pas faire de mousse.

c) *Ensemencement et répartition en tube.*

Ces opérations étaient toujours faites après l'addition de l'antiseptique.

4° ENSEMENCEMENT

C'est le point délicat de la technique; il faut, en effet, introduire dans les tubes d'une même expérience, un nombre égal de germes, vivants et de même âge.

a) *Répartition égale du nombre de germes.*

Pour faire une répartition égale du nombre de germes, il est nécessaire d'obtenir une dilution homogène. Dans ce but nous avons dilué la culture mère au 1/100^e dans du bouillon petit-lait, et nous avons ensuite soumis cette dilution à une agitation prolongée. La dilution au 1/100^e avait l'avantage de permettre l'ensemencement d'un volume important de culture, ce qui réduisait certainement les causes d'erreur. Nous avons employé la pipette Pasteur dont la terminaison longue et cylindrique permet un débit uniforme de gouttes.

b) *Élimination des éléments morts.*

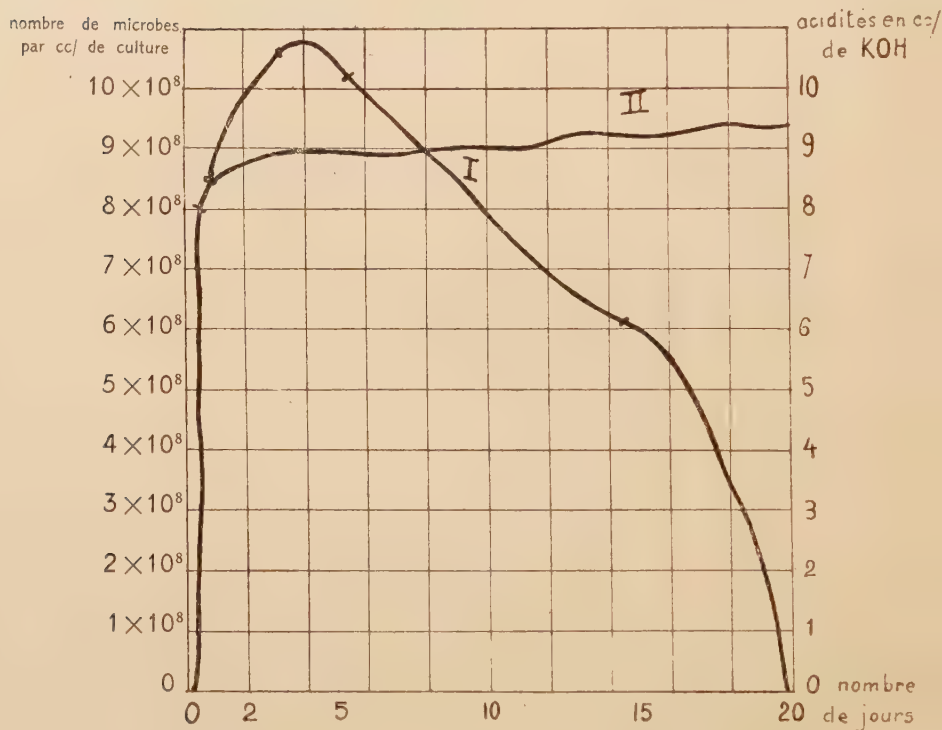
Pour éliminer les éléments morts, nous soumettons à une centrifugation moyenne, 5.000 tours à la minute, pendant une durée d'environ cinq minutes, le bouillon de culture mère; à la partie supérieure du tube de centrifugation se trouvent les bacilles vivants, dans le culot sont les amas de bacilles morts.

c) *Vérification de l'importance de l'âge des cultures.*

En effet, pendant les premières heures, l'acidité dans les cultures est proportionnelle à l'activité de fermenta-

tion et augmente en fonction du nombre de microorganismes vivants. Après vingt-quatre heures, l'acidité continue à augmenter, tandis que le nombre de microbes vivants diminue progressivement pour tomber à zéro vers le vingtième jour, si les tubes sont maintenus à 37°, dans un délai un peu plus long s'ils sont conservés à la température du laboratoire.

Graphique II



Rapport du nombre de microorganismes à la quantité d'acide lactique formé.

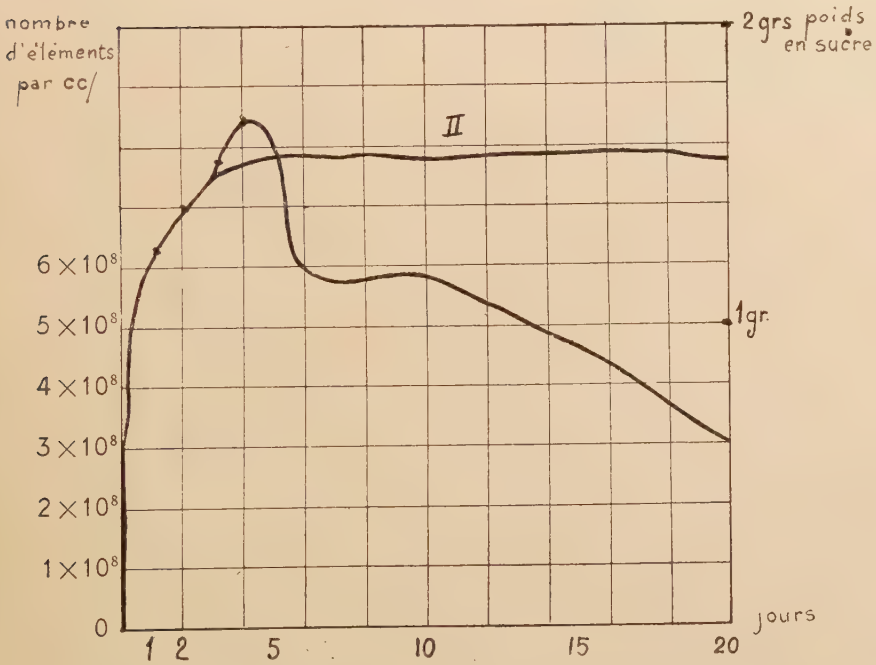
I. — Courbe établie en fonction du nombre d'éléments vivants.

II. — Courbe de l'acidité dans le même temps.

Dans le graphique II, nous superposons les courbes de l'acidité et du nombre de germes vivants en fonction du temps. La numération des germes a été faite par la numération des colonies obtenues, après ensemencement de dilutions, sur bouillon gélatiné en boîtes de Roux.

La même expérience a été reprise avec une levure de bière. Ce microorganisme présente l'avantage de posséder des éléments assez volumineux pour être comptés avec l'hématimètre, ce qui fournit, par numération directe, un procédé de contrôle à la méthode des dilutions et ensemencements sur plaques de gélatine.

Graphique III



Rapport du nombre de levures à la quantité d'alcool formée.

Le graphique III donne les résultats obtenus; nous avons également superposé les deux courbes : le nombre de cellules de levure vivantes et la quantité d'alcool formée. Les courbes sont assez semblables dans leur allure à celles du ferment lactique.

Pour un ferment lactique normal, l'acidité, mesurée dans un tube de culture, est en rapport direct avec le nombre de microbes pendant vingt-quatre heures. Ensuite, jusqu'au troisième jour environ, le nombre de microbes vivants continue à augmenter légèrement alors que l'acidité reste stationnaire. Après le troisième jour jusqu'à la mort des cultures, le nombre des microbes vivants diminue progressivement pour tomber à zéro vers le vingtième jour; l'acidité a peu varié, on constate seulement une légère augmentation.

Pour des cultures jeunes de vingt-quatre heures ou même de quarante-huit heures, il suffira de mesurer l'acidité pour connaître le nombre de microbes vivants.

Pourrons-nous opérer de la même façon lorsque nous aurons affaire à des ferments accoutumés.

EFFRONT a montré que le pouvoir fermentatif de certaines levures s'élève quand, en présence d'acide fluorhydrique, la végétation s'abaisse.

RICHET et M^{me} BACHRACH, en opérant sur des ferments lactiques accoutumés à de fortes doses de nitrate de thallium, constatent que le rapport du pouvoir fermentatif, ou nombre de microbes, est notablement plus élevé dans ces tubes que dans ceux des tubes témoins. (Ces auteurs définissent le pouvoir fermentatif par le rapport de l'acide lactique formé au poids sec des microbes.) Cependant, RICHET et M^{me} BACHRACH arri-

vent à cette conclusion : il est possible, dans la plupart des cas, de comparer le croît des microbes à leur activité cellulaire, et c'est la règle qu'ils emploient pour tous leurs travaux.

Nous avons voulu déterminer, chez des ferments accoutumés à des antiseptiques, la valeur de la variation du pouvoir fermentatif au nombre de germes.

TABLEAU N° I

Rapport du pouvoir fermentatif au nombre de germes dans le cas de souches accoutumées.

Pour établir ce rapport, nous avons employé des cultures de deux jours; nous mesurions l'acidité de ces cultures, puis après avoir soumis ces tubes à une agitation énergique, dans le but d'obtenir une égale répartition des germes dans tous les points du liquide, nous opérions des dilutions et ensemencements sur plaques de gélatine. Nous donnons dans le tableau suivant les résultats obtenus en partant d'une *même acidité de fermentation* dans les milieux (exprimée par 10 cc. de KOH à 2 0/00).

	Doses de toxiques en grammes par litre	Nombre de colonies par cc.	Rapport
Témoin souche normale	00	20×10^8	100
Souche accoutumée à HgCl^2	0.008 %	14×10^8	70
— $\text{No}^3 \text{ A}$	0.008	13×10^8	65
— Na F	2	15×10^8	75
— l'arséniate			
neutre de potasse	45	16×10^8	79
Souche accoutumée au phénol . . .	3	15×10^8	75

Pour une même acidité, nous constatons que la culture normale, non additionnée d'antiseptique, contient le nombre de germes 20×10^8 . Ce nombre de germes est nettement inférieur dans le cas de cultures accoutumées aux antiseptiques. Pour le bichlorure de mercure par exemple, 13×10^8 seulement de bacilles fournissent la même quantité d'acide lactique; la puissance de travail de chaque microbe en présence de bichlorure de Hg est de ce fait accrue dans la proportion de 13 à 20.

Au point de vue pratique, nous déduirons qu'il convient de procéder à des ensemencements avec un nombre de gouttes, inversement proportionnel à l'acidité et en fonction des rapports établis dans le tableau I.

5° DOSAGE DES CULTURES.

Pour terminer l'exposé de notre méthode, il reste à expliquer notre procédé de dosage de l'acidité dans les cultures. Le ferment lactique est un microbe de choix pour les recherches que nous avons entreprises. En végétant dans les milieux lactosés, il dédouble la matière sucrée et la transforme en acide lactique suivant la formule $C^6H^{12}O^6 = 2C^3H^6O^3$; il en résulte une forte acidification du milieu facilement mesurable; l'appréciation de l'activité de fermentation des tubes de cultures, par un titrage acidimétrique est des plus simples. Avant tout dosage les tubes sont plongés simultanément cinq minutes dans l'eau bouillante pour arrêter la fermentation. Après l'introduction dans chaque tube de deux gouttes de solution de phénol-phtaléine à 5 %, le dosage s'opère au moyen d'une liqueur potassique titrée à 2 0/00, en ayant soin

de ramener le réactif au zéro de la burette avant chaque filtrage.

Nous croyons devoir ajouter que chaque résultat enregistré dans notre travail, a été vérifié à plusieurs reprises afin d'écartier la part d'erreur possible que toute expérimentation nouvelle peut comporter lorsqu'elle n'a pas été suffisamment contrôlée.

ACTION DES DIVERS TOXIQUES SUR LA VÉGÉTATION DU FERMENT LACTIQUE

Nous avons utilisé :

Des antiseptiques minéraux forts : bichlorure de mercure, azotate d'argent.

Des antiseptiques minéraux faibles : arséniate de potasse, fluorure de sodium.

Un antiseptique organique : le phénol.

En premier lieu, nous avons recherché l'action du toxique en fonction de la dose sur un ferment lactique normal, et nous avons ainsi établi pour chaque corps une courbe représentant la relation entre les teneurs d'antiseptique et les quantités d'acide lactique formées. Voici les résultats de nos essais :

CAS DU BICHLORURE DE MERCURE

Tableau II. — Graphique IV.

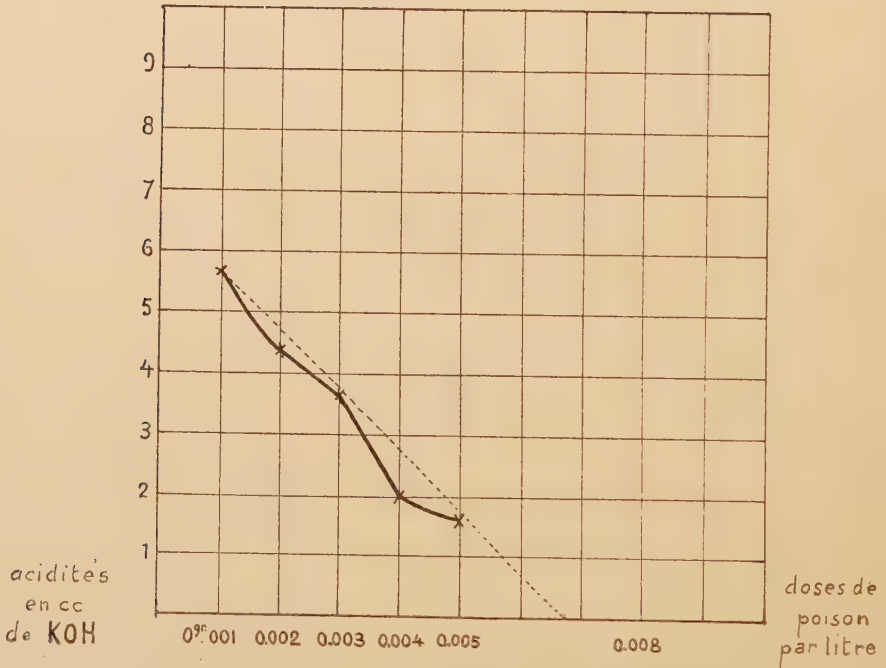
On remarque que le tracé est très voisin d'une ligne droite et que, par conséquent, l'acidité du bouillon devient inversement proportionnelle à la quantité d'antiseptique introduite dans le milieu.

Tableau II

1° Bichlorure de mercure.

Témoins	Doses de poison par litre	Acidités
	00	9.1
	0.001 $\frac{0}{60}$	5.6
	0.002	4.2
	0.003	3.8
	0.004	2
	0.005	1.6

Graphique IV



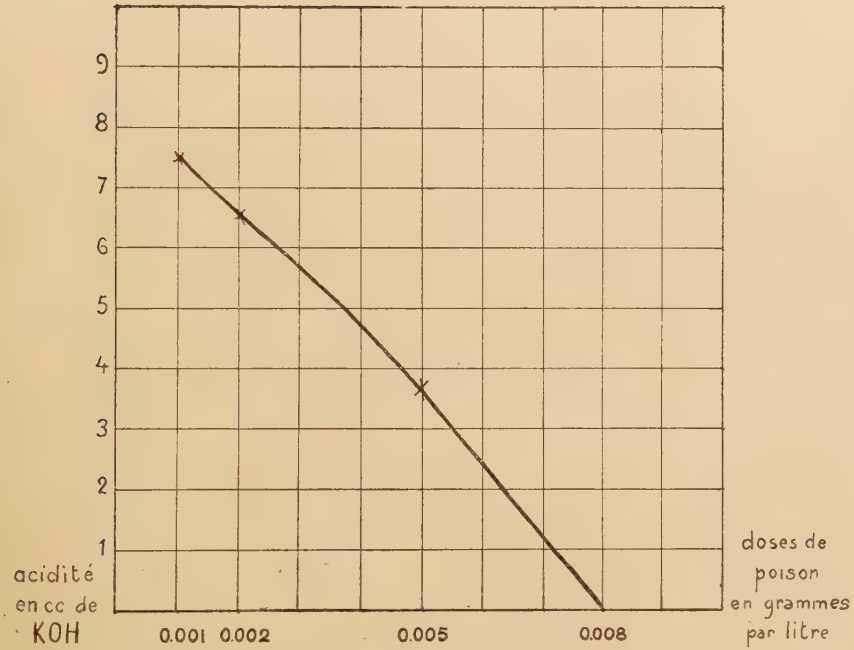
Action du sublimé sur la végétation d'un ferment lactique normal.

CAS DE L'AZOTATE D'ARGENT

Tableau III

Témoins	Doses de poison par litre	Acidités
	00	8.1
	0.001 ^{0/00}	7.4
	0.002	6.8
	0.005	3.7
	0.008	0

Graphique V



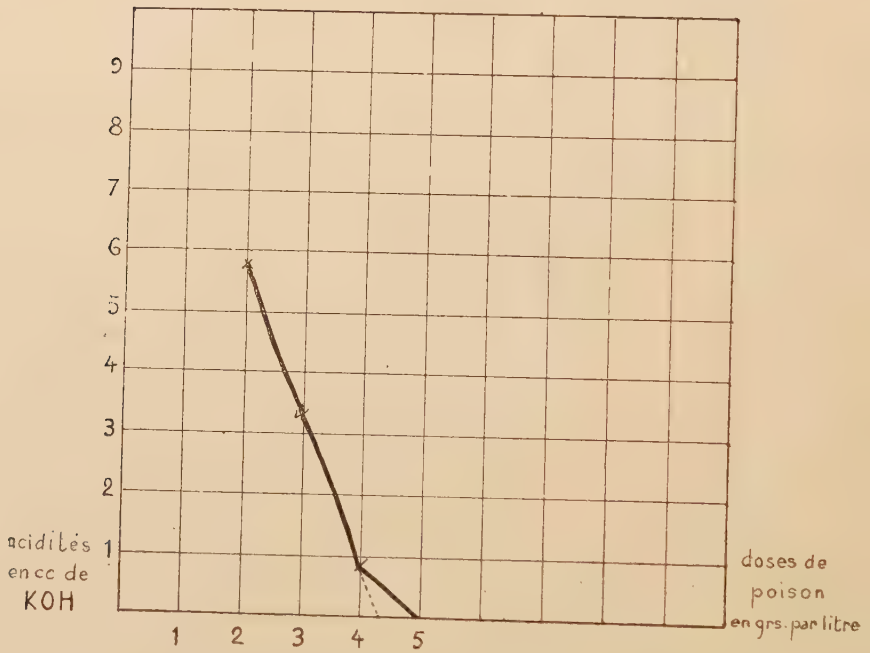
Action de l'azotate d'argent sur la végétation d'un
ferment lactique normal.

CAS DU PHÉNOL

Tableau IV

Témoins	Doses de poison par litre	Acidités
	00	8.5
	2 0/00	5.8
	3	3.1
	4	0.7
	5	0

Graphique VI



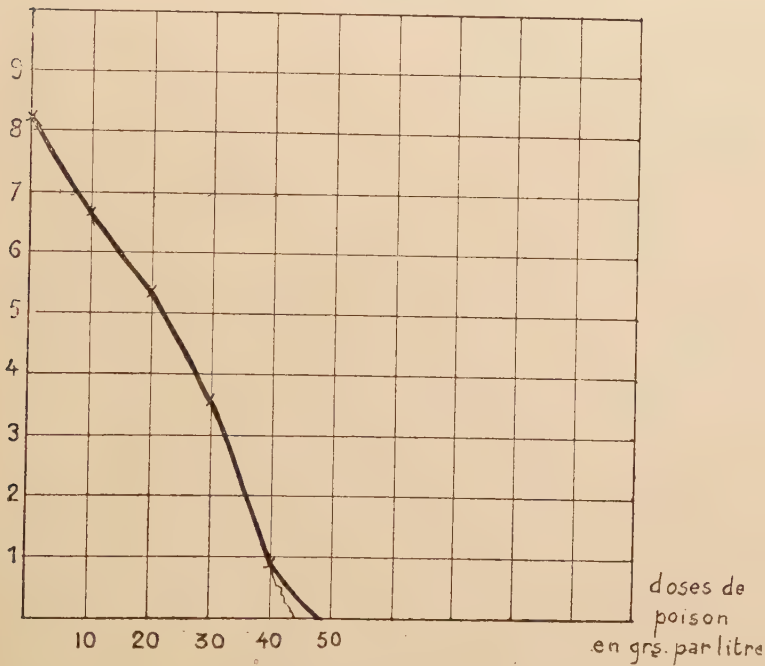
Action du phénol sur la végétation d'un
ferment lactique normal.

CAS DE L'ARSÉNIATE DE POTASSIUM

Tableau V

Témoins	Doses de poison par litre	Acidités
	00	8.2
	10	6.4
	20	5.3
	30	3.4
	40	0.9
	50	0

Graphique VII



Action de l'arséniate de potasse sur la végétation
d'un ferment lactique normal.

Tous les graphiques *se traduisent également par des droites*. En augmentant la quantité d'antiseptique nous sommes arrivés à établir la dose incompatible avec la végétation du microbe.

Cette dose, pour un antiseptique donné, est parfaitement déterminée, constante, quelles que soient les conditions de l'expérience.

Cette dose, que nous appellerons « dose antivégétative », est pour notre ferment lactique :

Avec le bichlorure de mercure	0 gr. 008 ‰
Avec l'azotate d'argent	0 gr. 008
Avec le fluorure de sodium	3 gr.
Avec le phénol	5 gr.
Avec l'arséniate neutre de potasse ...	45 gr.

Nous faisons remarquer que la dose antivégétative n'est pas la dose mortelle : le microbe qui a séjourné dans le milieu de culture contenant la dose antivégétative d'antiseptique est capable de se reproduire si on le remet dans un milieu normal.

Nous avons recherché alors, quelle était la « dose mortelle » de chacun des poisons pour le ferment lactique :

Pour le bichlorure de mercure	0 gr. 1 ‰
Pour l'azotate d'argent	0 gr. 05
Pour le fluorure de sodium	5 gr.
Pour l'arséniate neutre de potasse....	150 gr.
Pour le phénol	9 gr.

CONDITIONS DE L'ACCOUTUMANCE A UN TOXIQUE DONNÉ

Nous venons de voir qu'un ferment lactique végète mal sur un milieu additionné d'une dose, même faible, de sel toxique et qu'il est incapable de pulluler sur un milieu contenant une dose déterminée, que nous avons appelée la dose antivégétative. Mais, progressivement, par des réensemencements successifs sur des milieux de plus en plus riches en sels toxiques, il se produit une adaptation du microbe qui devient capable de vivre, de se reproduire, et de fabriquer de l'acide lactique sur ces milieux. Nous verrons le microbe supporter des doses de plus en plus élevées, dépassant la dose antivégétative, pour arriver à une dose limite de poison que nous appellerons « dose végétative maxima » pour le microbe accoutumé, constante, quelles que soient les conditions expérimentales.

Nous étudierons successivement la marche, les conditions et les valeurs de cette accoutumance pour chacun des antiseptiques employés.

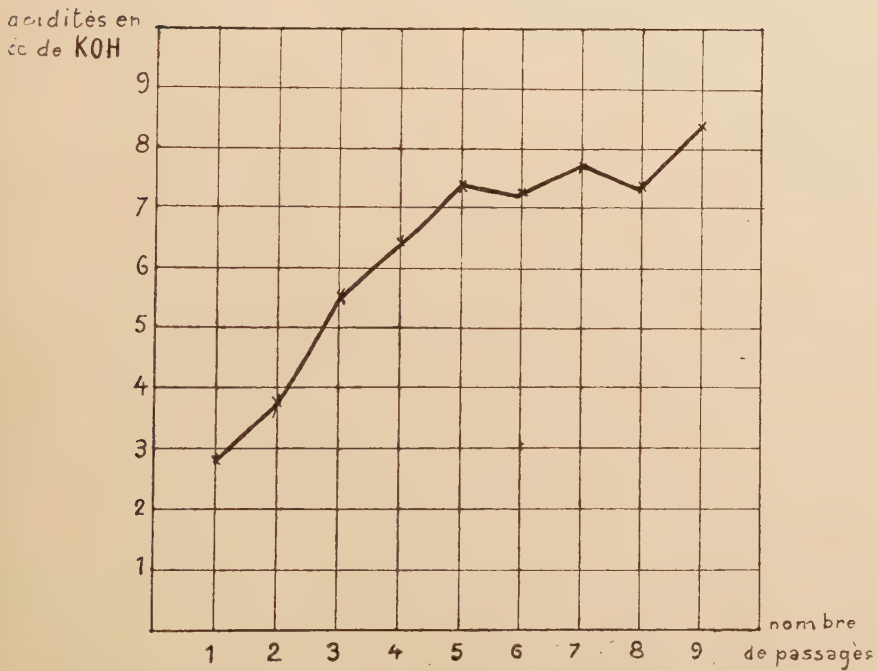
1° MARCHE DE L'ACCOUTUMANCE A UNE DOSE FAIBLE

Dans une première courbe nous montrerons comment se comporte le microbe réensemencé pendant plusieurs passages sur une dose assez faible de toxique. En effet, celle-ci est choisie pour qu'elle réduise seulement de 50 % environ la végétation dans un tube témoin. Nous verrons ainsi comment se fait la variation de l'acidité depuis le premier passage jusqu'au dernier; dans quelle mesure cette acidité est capable d'augmenter et de traduire ainsi la faculté d'accoutumance du microbe. Pour chaque passage les souches ont été repiquées tous les trois jours; elles ont de plus subi trois repiquages successifs sur la même dose de toxique.

Tableau : HgCl^2 à 0,001 %.

Nombre de passages	Acidités	Acidité des témoins	
		sans antiseptique	avec 0 001 ‰ de sublimé
1	2.9	8.6	2.9
2	3.7		
3	5.6		
4	6.2		
5	7.4		
6	7.1	8.8	3.1
7	7.5		
8	7.4		
9	8.4		

Graphique VIII



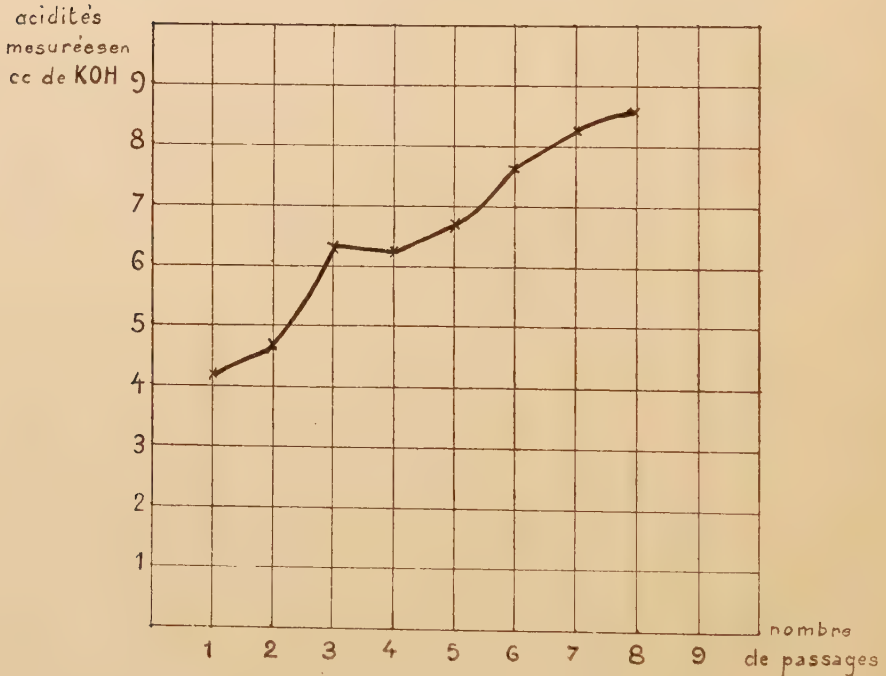
Courbe établissant l'accoutumance d'un ferment lactique en neuf passages sur un milieu à 0,001 de bichlorure de mercure.

CAS DE L'ARSÉNIATE DE POTASSE

Tableau : arséniate de potasse 25 0/00.

Nombre de passages	Acidités	Acidité des témoins	
		sans antiseptique	avec 25 gr 0/00 d'arséniate
1	4.1	8.2	4.1
2	4.6	8.5	
3	6.3	8	
4	6.2		
5	6.5		
6	7.6		
7	8.1		
8	8.3	8.5	4.6

Graphique IX



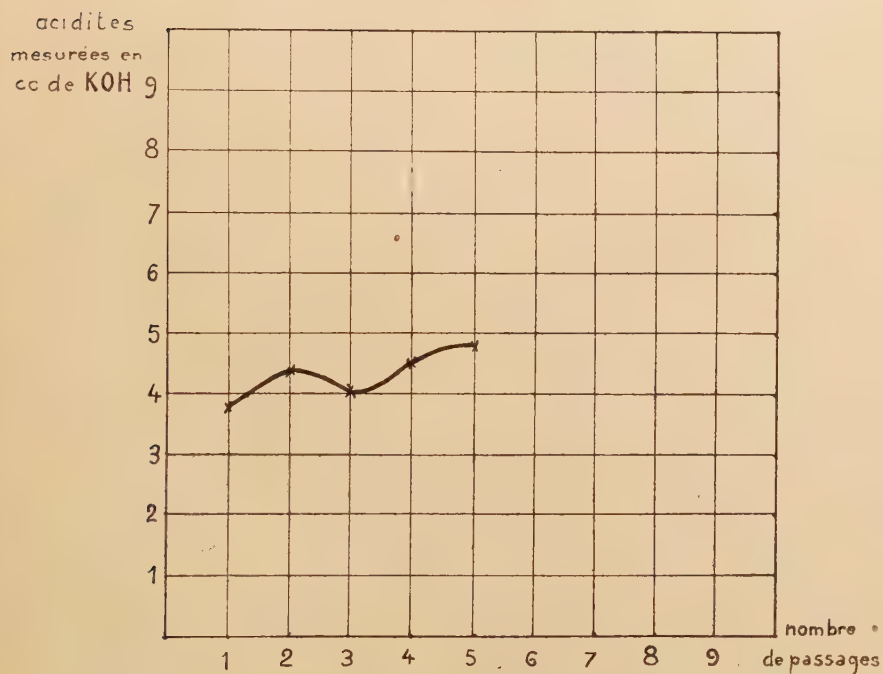
Courbe de l'établissement de l'accoutumance pour un ferment lactique pendant huit passages sur un milieu à 25 gr. % d'arséniate de potasse.

CAS DU PHÉNOL

Tableau : Phénol 1 gr. 6 %.

Nombre de passages	Acidités	Acidité des témoins	
		sans antiseptique	avec 0,001 gr. 6 $\frac{0}{100}$ de Phénol
1	3.9	8.1	3.9
2	4.2		
3	4		
4	4.6	8	3.9
5	4.8		

Graphique X



Courbe établissant l'accoutumance d'un ferment lactique en cinq passages sur un milieu à 1 gr. 6 % de phénol.

Si nous examinons le premier de ces graphiques, cas du bichlorure de mercure, nous voyons au début l'acidité réduite de 70 % dans les tubes de culture. Elle augmente peu à peu par une progression régulière; le rapport de la diminution de l'acidité devient égal à 40 % au quatrième passage, c'est-à-dire après quinze jours. Au bout de vingt-sept jours, il est égal à 10 %. *Cela revient à dire que le ferment accoutumé à vivre en présence d'un milligramme de bichlorure de mercure par litre fait fermenter les sucres avec une activité presque égale à celle du ferment normal sur milieu normal.* Les mêmes constatations seraient à répéter pour les autres antiseptiques.

Il résulte donc que l'accoutumance, pour une dose faible constante, ne peut s'établir qu'au bout d'un certain temps. La marche du phénomène est régulièrement progressive. Nous n'avons pas enregistré, quelle que soit la nature de l'antiseptique, de brusques variations dans la mesure de l'acidité de nos cultures.

Cependant RICHET avait constaté, dans ses essais d'accoutumance du ferment lactique au nitrate de thallium et au bichlorure de mercure, une augmentation subite de l'activité fermentative pour certains des tubes de l'expérience; au réensemencement suivant, l'activité s'abaissait subitement et, avec la même inconstance, pouvait s'élever à nouveau brusquement après des réensemencements successifs.

Les conclusions de cet auteur étant en désaccord avec nos premiers résultats, nous pouvions croire que le phénomène d'accoutumance s'établissait seulement avec régularité quand l'antiseptique était ajouté à faible dose.

Il convenait d'augmenter progressivement les doses de poison et arriver ainsi à une dose assez considérable.

Nous avons étudié particulièrement le bichlorure de mercure considéré, par nos devanciers, comme un « antiseptique irrégulier » différent des autres dans ses manifestations sur l'activité du ferment lactique et ne suivant pas les mêmes lois.

2° MARCHÉ DE L'ACCOUTUMANCE A DES DOSES CROISSANTES

Voici résumé, dans un tableau qui rendra plus com- mode la lecture des résultats, les acidités fournies par le ferment lactique végétant en présence de doses crois- santes de bichlorure de mercure. Nous sommes partis d'une dose faible, un milligramme par litre; après trois passages, pendant lesquels les tubes et les ballons res- taient trois jours à l'étuve, nous avons doublé la dose de toxique. Sur ce milieu nous avons pratiqué également trois passages. En augmentant chaque fois la dose de toxique de une fois et demie ou deux fois sa valeur, nous sommes arrivés à 12 milligrammes par litre.

Nombre de passages	Doses toxiques	Acidité au dernier passage	Acidités des témoins ferment normal sur milieu normal
HgCl_2 { 1 2 3	0.001 0/00	5.6	9.9
4 5 6	0.002	6.3	8.9
7 8 9	0.004	5.9	8.5
10 11 12	0.006	5.9	8.4
13 14 15	0.008	5.6	8.7
16 17 18	0.012	5.2	8 5

Ces chiffres montrent que l'établissement du phénomène de l'accoutumance pour le bichlorure de Hg ne se fait pas par de brusques variations. Les acidités obtenues après les différents passages ne se traduisent pas par des chiffres très différents les uns des autres.

Nous verrons maintenant qu'il en est de même pour les autres antiseptiques employés.

CAS DU FLUORURE DE SODIUM

	Passages			Doses toxiques par litre		Acidités au dernier passage	Acidités des témoins
	—	—	—	—	—	—	—
Na F . . .	1.	2.	3.	1 gr.	‰	3,1	9,9
	4.	5.	6.	1 gr. 5	‰	3,5	8,5
	7.	8.	9.	3 gr.	‰	3,1	8,1
	10.	11.	12.	4 gr.	‰	3,1	8,5

CAS DU PHÉNOL

Phénol . .	1.	2.	3.	1 gr. 6	‰	3,	9,9
	4.	5.	6.	2 gr. 4	‰	3,4	8,6
	7.	8.	9.	3 gr. 2	‰	3,1	8,2
	10.	11.	12.	4 gr. 8	‰	2,7	8,5

CAS DE L'ARSÉNIATE

Arséniate .	1.	2.	3.	5 gr.	‰	7,4	9,9
	4.	5.	6.	10 gr.	‰	8,2	9,9
	7.	8.	9.	24 gr.	‰	8,	9,4
	10.	11.	12.	48 gr.	‰	7,9	8,5

3° MARCHE DE L'ACCOUTUMANCE A UNE DOSE FORTE

Avant de formuler une conclusion définitive, il nous reste à examiner comment se comporte le ferment lactique lorsqu'il est placé en présence d'une dose constante et très forte de toxique. Nous mentionnerons les expé-

riences faites en utilisant le bichlorure de mercure à 0 gr. 027 0/00.

Nombre de passages	Acidités	Acidités des témoins
1	6,1	8,5
2	6,5	8,6
3	6,8	8,6
4	4,1	6,3
5	6,9	8,6
6	6,8	8,5

Lors du quatrième passage, nous trouvons une diminution brusque de l'acidité; mais une même diminution a été observée chez les témoins et paraît donc due à une circonstance fortuite, abaissement de la température de l'étuve ou faute dans la confection des milieux.

Après l'exposé de ces chiffres nous pouvons conclure à l'établissement progressif et régulièrement continu du phénomène de l'accoutumance.

Nous sommes sur ce point en accord avec les observations de TAYSEN et de REICHENBACH.

Certains auteurs, au contraire, ont noté dans leurs essais une augmentation brusque du degré d'accoutumance, pour quelques-uns de leurs tubes de culture, alors que tous les autres tubes continuaient l'évolution progressive. Cette variation inattendue a été considérée comme une véritable « mutation brusque », au sens de DE VRIES.

Il faut se rapporter aux travaux de GORINI, R. MASSINI, BAERTHELM, TËNISSEN, M. RICHET et ses collaborateurs pour trouver des faits de ce genre.

Cependant la mutation observée ne présente pas de ca-

ractères vraiment stables. Il suffit de peu de temps, parfois vingt-quatre heures, pour que les propriétés acquises se perdent brusquement : ce sont les rétromutations de GORINI.

Nous ne chercherons pas une explication à ces discordances dans les résultats ; nous nous bornons à enregistrer des faits. Cependant nous croyons pouvoir terminer cette discussion en citant une phrase de M. A. LUMIÈRE : « La mutation vraie chez le microbe qui se reproduit par scissiparité sans fécondation par d'autres individus devraient comporter la permanence du caractère qui a surgi accidentellement. »

*
**

Nous avons vu que par des repiquages successifs sur des milieux contenant des doses croissantes d'antiseptique, on pouvait obtenir des microbes accoutumés aux toxiques employés. Nous sommes amenés à nous demander si ceux-ci sont capables de supporter des doses de plus en plus élevées de poison. N'existerait-il pas au contraire une dose limite au-dessus de laquelle il serait impossible d'obtenir une continuation en série des cultures.

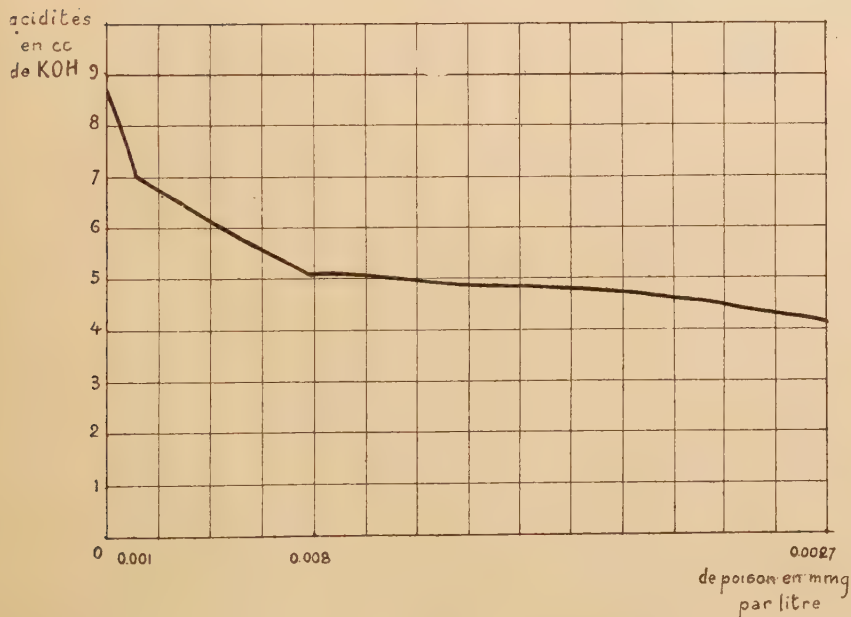
Nous sommes en état de répondre à cette question.

Il résulte de nos expériences qu'il existe, pour un microbe déterminé et un antiseptique donné, une dose limite de poison, que l'on peut toujours atteindre par des repiquages suffisamment nombreux, mais qu'on ne peut jamais dépasser.

Par exemple, on peut toujours, en opérant convena-

blement, arriver à accoutumer le ferment lactique jusqu'à la concentration de 0 gr. 027 de sublimé par litre de bouillon. Mais on ne peut jamais dépasser cette dose. Nous avons gardé pendant deux ans au laboratoire de M. LUMIÈRE, trois souches de bacilles lactiques accoutumés à cette dose de bichlorure de mercure et, chaque fois que nous avons essayé d'augmenter la concentration du toxique, nous avons arrêté la fermentation. Cette dose de toxique nous l'appellerons la « dose maxima de végétation » pour le ferment accoutumé.

Graphique XI



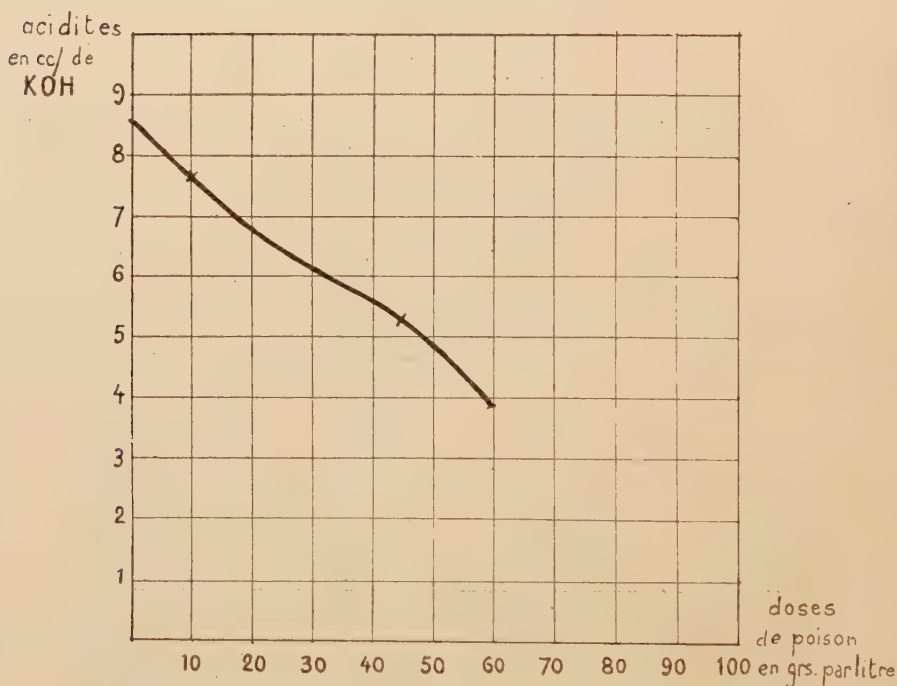
Influence de la dose du poison sur le pouvoir fermentatif du bacille lactique accoutumé au bichlorure de mercure

Nous l'avons déterminée pour chacun des antiseptiques suivants :

Pour HgCl_2	0 gr. 027 ‰
Pour $\text{NO}_3 \text{ Ag}$	0 gr. 012 ‰
Pour Na Fl	3 gr. ‰
Pour phénol	4 gr. ‰
Pour Arséniate	50 gr. ‰

Cette dose maxima ne représente pas théoriquement la dose limite du poison qui se déduirait par l'examen de graphiques ainsi que nous allons le voir. Pour mieux préciser l'influence qu'exerce le poison sur la vitalité du

Graphique XII



Influence de la dose de poison sur le pouvoir fermentatif du bacille lactique accoutumé à l'arséniate de potasse neutre.

bacille accoutumé à des doses plus ou moins fortes, essayons de construire des graphiques en portant en abscisses les doses de poison et en ordonnées les acidités obtenues par l'accoutumance sur ces doses.

Ces courbes représentatives du phénomène coupent l'axe des abscisses en un point plus reculé que celui déterminé par l'expérience. Dans la marge qui nous sépare du point où l'acidité est égale à zéro, il y aurait encore plusieurs doses compatibles avec une culture. L'accoutumance pour être plus complète devrait être poussée plus avant et les doses atteindre les chiffres qui sont entrevus sur les graphiques précédents. Pour le bichlorure de mercure, par exemple, la dose maxima devrait, théoriquement, égaler 0,04 alors que pratiquement les cultures sont impossibles lorsqu'on dépasse une toxicité mesurée par 0 gr. 027 de bichlorure par litre.

PUISSANCE D'ACCOUTUMANCE

Maintenant que nous connaissons la dose limite du poison compatible avec le développement d'une culture de ferment accoutumé, il nous sera facile de calculer la valeur exacte de l'accoutumance vis-à-vis de chaque antiseptique, par un rapport que nous établirons en fonction de la dose antivégétative (pour la souche normale) et de la dose maxima (dose antivégétative pour les souches accoutumées).

HgCl ²	$\frac{0.078}{0.008}$	= 3,3
No ³ Ag	$\frac{0.012}{0.008}$	= 1,5
NaFl	$\frac{2}{3}$	= 1,5

Arséniate	$\frac{45}{60}$	= 1,3
Phénol	$\frac{3}{4}$	= 1,3

Au dividende, nous avons porté la dose maxima par litre d'antiseptique dans laquelle nous avons pu, grâce à l'accoutumance, faire pulluler nos cultures et au diviseur la dose empêchant le développement de bactéries non accoutumées. On voit immédiatement, en consultant notre tableau, qu'on peut par le phénomène d'accoutumance, faire végéter le bacille lactique dans un milieu contenant un peu plus de trois fois la dose de bichlorure de mercure compatible avec une végétation du bacille lactique non accoutumé. Avec les autres antiseptiques l'accoutumance est moins importante puisqu'on n'arrive pas à doubler la dose primitive.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux que nous trouvons dans le travail de Hans REGENSTEIN. Cet auteur détermine l'accoutumance du staphylocoque pour le phénol, égale à 1,7 la valeur de la dose supportée par la souche primitive; pour le sublimé le rapport égale 1,3; dans le cas du coli-bacille, les chiffres correspondants sont 1,3 et 1,6. Pour le bacille typhique, ils sont 1,2 et 1,5. SEINEI AKATSU et HIDAYO NOGUCHI donnent les chiffres suivants : trypanosoma pallidum peut acquérir en trois à quatre mois la faculté de vivre en présence de doses de salvarsan et de néo-salvarsan égales à 5 fois 1/2 leur valeur originelle; avec le bichlorure de mercure, la mesure de l'accoutumance est encore plus complète, en dix semaines, ces auteurs arrivent à 10 fois la dose pri-

initive pour *trypanosoma microdentium* et 70 fois pour *trypanosoma pallidum*.

Les chiffres du tableau précédent montrent de toute évidence que le ferment lactique peut être entraîné par adaptation à vivre en présence des poisons. Le phénomène d'accoutumance est tangible. Il présente une valeur et un intérêt appréciables, l'augmentation de résistance du microbe s'établissant pour un pourcentage assez élevé de l'antiseptique. Nous pouvons de même penser que l'accoutumance est indépendante de l'antiseptique, elle s'établit pour chacun de la même façon et les graphiques qui traduisent les lois sont les mêmes pour l'un quelconque d'entre eux.

Afin d'être plus à même de généraliser encore davantage, nous avons repris les expériences avec d'autres substances de compositions chimiques différentes : Un colorant, la trypaflavine, des composés nitrosés, un sel de mercure du gaïacol sulfonate de sodium (le thiocol) ; les mêmes constatations ont été faites. Nous nous trouvons donc en présence d'un fait d'ordre général.

SPÉCIFICITÉ DE L'ACCOUTUMANCE

Le microbe ayant acquis, du fait de son adaptation, une résistance relative à un poison, nous pouvons nous demander si cette résistance sera spécifique ou si elle se manifestera chaque fois que le microbe sera placé dans un milieu peu favorable à sa végétation, parce que trop pauvre en éléments nutritifs ou parce que contenant un poison différent de celui auquel il a été adapté. En résumé, l'accoutumance est-elle une augmentation de résistance de l'individu ou l'acquisition de propriétés spécifiques nouvelles.

Voyons d'abord comment le ferment lactique accoutumé à un toxique se comporte quand il est transporté sur un milieu renfermant un antiseptique différent.

ACTION DE HgCl_2 SUR LE FERMENT LACTIQUE ACCOUTUME A $\text{NaO}^3 \text{Ag}$, Na F , A $\text{SO}^4 \text{K}^3$, AU PHENOL

Sur un milieu contenant 0 gr. 006 0/00 de bichlorure de mercure (dose inférieure à la dose antivégétative), nous avonsensemencé les diverses souches accoutumées à nos différents antiseptiques. Les résultats proviennent

de dosages effectués après séjour des tubes, quarante-huit heures à l'étuve.

		Acidités en KHO à 2 ‰
		—
Ferment normal	1 cc.	
Ferments accoutumés à NO ³ Ag 0,008	1 cc. 2	
— — — 0,012	0 cc. 8	
— — NAF 2 ‰	1 cc. 2	
— — — 3 ‰	1 cc. 1	
— — phénol 3 ‰	1 cc. 1	
— — — 4 ‰	1 cc. 1	
— — l'arséniate de potasse 45 ‰	1 cc. 2	
— — — 60 ‰	1 cc. 1	

Le tableau suivant répète la même expérience en employant comme milieu d'épreuve le fluorure de sodium à 1 gr. 6 0/00.

		Acidités en KOH à 2 ‰
		—
Ferment normal	1,6	
Ferments accoutumés à AZO ³ Ag 0 gr. 008 ‰	1,3	
— — — 0 gr. 012 ‰	1,3	
— — HgCl ² 0 gr. 008	1,8	
— — — 0 gr. 027	1,6	
— — phénol 3 gr.	1,7	
— — — 4 gr.	1,7	
— — l'arséniate de potasse 45 gr.	1,7	
— — — 60 gr.	1,7	

Ces deux tableaux montrent de toute évidence que les ferments accoutumés à un poison donné se comportent vis-à-vis d'un antiseptique différent comme le ferment normal.

Mais il faut encore faire avec certains auteurs une distinction de classe et de fonctions chimiques dans l'ac-

tion des poisons sur la cellule microbienne. EHRLICH et ses élèves ont montré que les microorganismes présentent une résistance d'adaptation pour les corps d'un même groupe chimique et quelquefois aussi pour les corps différents et non voisins chimiquement, acridine, pyronine et atoxyl. M^{me} BACHRACH, ayant repris la question dans sa thèse, arrive aux mêmes conclusions.

Nous avons observé que le fluorure de sodium et le fluorure de potassium sont interchangeables. Les bacilles lactiques accoutumés au premier se montrent résistants vis-à-vis du second; dans ce cas, c'est la fonction fluorure qui joue le rôle important. Mais si nous employons par contre le fluorure, le bromure et l'iodure de sodium, nous retrouvons une spécificité très nette pour chacun de ces poisons. C'est ce qui se passe également pour l'iodoforme et le chloroforme. Dans ce cas, il n'y a pas accoutumance pour le groupement chimique défini.

Il existe pour le ferment lactique une accoutumance spécifique réelle et entière vis-à-vis de poisons différents; une souche accoutumée au phénol l'est seulement au phénol et non au bichlorure de mercure, au fluorure de sodium ou à l'arséniate de potasse, corps appartenant tous à des classes chimiques très différentes. La spécificité est relative lorsqu'on opère sur des corps très voisins.

ACCOUTUMANCE SIMULTANÉE A PLUSIEURS POISONS

Ayant ainsi constaté que la cellule vivante peut s'accoutumer à un poison, nous avons étendu nos recherches aux actions surajoutées de plusieurs toxiques sur les réactions physiologiques de la cellule.

Avant d'aborder ce nouveau point, nous préciserons deux conditions que se présenteront suivant le choix des antiseptiques dont on étudiera le mélange.

1° Les corps seront indifférents chimiquement vis-à-vis l'un de l'autre et, mis dans le milieu, ne se combineront pas entre eux pour former de nouveaux composés. Ou bien :

2° Les corps réagiront chimiquement entre eux et le milieu contiendra un nouveau mélange de corps toxiques. Il est bien évident que, dans ce cas, nos expériences porteront sur une accoutumance nouvelle à des corps différents de ceux primitivement introduits dans le bouillon. Il serait par suite illusoire de comparer les résultats obtenus avec ce nouveau complexe et ceux qui sont fournis par les deux toxiques séparés. Si nous nous reportons aux travaux de M. RICHET et de ses élèves qui ont étudié cette question, nous remarquerons qu'ils n'ont pas men-

tionné ces distinctions et que leurs recherches portent sur de nombreux antiseptiques qui réagissent en présence l'un de l'autre. Nous craignons qu'il n'y ait là, dans certains cas tout au moins, une cause d'erreur. Tel est le cas de l'arséniate de potasse ajouté dans le milieu à la dose de 0 gr. 007 0/00 en présence de sulfate de cuivre à 0 gr. 002 0/00.

Lorsqu'on mélange des solutions suffisamment concentrées d'arséniate de potasse et de sulfate de cuivre, il se précipite de l'arséniate de cuivre et il se forme du sulfate de potassium dans la liqueur. Si les solutions sont suffisamment étendues, le précipité d'arséniate de cuivre ne se forme pas, parce que ce corps est un peu soluble dans l'eau. Mais la double décomposition ne s'effectue pas moins dans de certaines limites. Il est probable qu'en liqueur diluée la double décomposition n'est pas intégrale, il se fait un partage, les sels étant plus ou moins ionisés en solutions diluées.

Si l'on veut éviter les combinaisons qui risqueraient de modifier les conditions de l'expérience, on ne peut envisager pour nos cinq séries de souches accoutumées au bichlorure de mercure, sulfate d'argent, fluorure de sodium, arséniate de potasse et phénol, que trois arrangements possibles :

NaF et Arséniate.

NaF et HgCl².

NaF et Phénol.

1° ETUDE PRÉLIMINAIRE

En premier lieu nous rechercherons si, pour une cellule microbienne normale, les actions toxiques des deux

poisons s'ajoutent l'une à l'autre. La moitié de la dose antivégétative de l'un et la moitié de la dose antivégétative de l'autre peuvent-elles empêcher la prolifération ? Dans des ballons de culture contenant la moitié de la dose antivégétative d'un antiseptique et la moitié de la dose antivégétative d'un autre, nous avonsensemencé une souche normale. Après trois jours de séjour à l'étuve aucune végétation ne s'était produite, les milieux étaient restés clairs.

1° Mélange NaF 1 gr. 0/00 plus arséniate 10 gr. 0/00, pas de culture.

2° Mélange NaF 1 gr. 0/00 plus HgCl^2 0 gr. 004 0/00, pas de culture.

3° Mélange NaF 1 gr. 0/00 plus phénol 1 gr. 5 0/00, pas de culture.

Nous avons vérifié naturellement qu'au bout des trois jours d'étuve les microbes étaient toujours vivants; ils cultivaient facilement sur le milieu normal.

Qu'il s'agisse de doses empêchant la prolifération ou de doses stérilisantes, nous notons des conclusions identiques. L'expérience précédente a été reprise en ajoutant dans les tubes d'une culture de vingt-quatre heures en milieu normal, une demi-dose stérilisante d'un toxique et une demi-dose stérilisante d'un autre toxique. Les deux réactions se sont additionnées l'une à l'autre ainsi que nous pouvions le prévoir après l'essai préliminaire; nous avons ainsi déterminé la mort des cultures.

Les effets toxiques des deux poisons se sont donc ajoutés pour agir immédiatement sur le protoplasma de la cellule. En sera-t-il de même lorsque ces effets devront agir

dans le temps pour produire une modification physiologique de la cellule, c'est-à-dire l'accoutumance. Quelles seront alors les modalités de cette accoutumance dans le cas du mélange total des poisons ajoutés, et pour les composants respectifs de ce mélange.

2° ACCOUTUMANCE AU MÉLANGE DE DEUX POISONS

La technique utilisée est évidemment la même, qu'il s'agisse de plusieurs toxiques ou d'un seul.

Le point de départ, c'est-à-dire la valeur de la première dose d'antiseptique, sera égale pour chacun des composants du mélange à un quart de la dose antivégétative. Comme la toxicité totale du mélange est égale à la somme des deux toxicités, nous obtenons dans les tubes de culture une diminution de végétation de 50 % après mélange; l'accoutumance étant établie pour le mélange total, nous allons voir maintenant si elle est établie aussi pour chacun des toxiques pris en particulier.

a) Nous prenons, par exemple, la première souche accoutumée à 1 gr. 0/00 de NaFl + 20 gr. 0/00 d'arséniate de potasse neutre. Nous l'enseménçons sur un milieu contenant aussi 20 gr. 0/00 d'arséniate, mais ne contenant pas de fluorure de sodium. Le microbe végète et donne une acidité supérieure à celle d'un microbe qui ne serait pas accoutumé.

b) La même souche estensemencée sur milieu contenant seulement 45 gr. 0/00 d'arséniate neutre de potasse. L'acidité de fermentation est comparable à celle d'un ferment normal.

c) La même souche estensemencée ensuite sur milieu contenant seulement du fluorure, on observe des résultats identiques.

L'accoutumance ne peut se faire pour chacun des poisons d'un mélange que pour la dose contenue dans le mélange.

PROPRIÉTÉS DES MICROBES ACCOUTUMÉS

Nos expériences antérieures nous ont mis en possession de souches pleinement accoutumées, dont les microbes ont acquis des propriétés nouvelles, puisqu'ils poussent sur un milieu toxique là, où le ferment lactique normal est incapable de le faire.

Pendant deux ans nous avons conservé au laboratoire de M. LUMIÈRE des souches de microbes accoutumés à différents toxiques. Cela nous a permis d'étudier facilement les propriétés nouvelles acquises par ces microbes.

1° L'activité fermentative des microbes accoutumés est notablement augmentée par rapport à celle des microbes normaux.

Cette propriété fondamentale a été mise en évidence par nombre d'auteurs : EFFRONT, M. M. RICHET, CARDOT, M^{me} BACHRACH; nous l'avons étudiée au début de ce travail et elle nous a servi également, au cours de cette étude à réaliser l'égale répartition des germes dans les cultures.

2° Par contre, l'activité de reproduction est modifiée en sens contraire, elle est diminuée par rapport à celle des

témoins. Il est bien certain que l'accoutumance permet d'obtenir une végétation sur des doses d'antiseptiques où primitivement le microbe ne se serait pas reproduit; cependant le temps de contact peut être prolongé indéfiniment, sans qu'il soit possible d'obtenir, même dans ces conditions, une végétation aussi intense que celle observée pour le ferment normal vivant sur milieu normal. Cette diminution d'activité est proportionnelle à la dose de poison. Examinons en effet les chiffres fournis par des dosages relevés au cours de l'établissement de l'accoutumance. Soit une de nos expériences avec le bichlorure de mercure. Le microbe normal sur milieu normal donne 10,9 d'acide lactique, taux que nous exprimerons par le nombre 100. Accoutumé à la dose de 1 milligr. de HgCl_2 , le microbe produit dans le milieu une acidité qui tombe à 6,4, soit, par rapport avec les témoins, 58 %. Enfin accoutumé à la dose maxima, 27 milligr., il donne encore 2,4 d'acidité, soit 22 %. La courbe représentant l'expérience est dessinée dans le graphique XI. Nous avons également obtenu des courbes analogues pour les autres antiseptiques, nous nous contenterons de reproduire ici les chiffres pour l'arséniate de potasse.

Soit donc encore, le cas de l'arséniate, le ferment normal sur milieu normal donne 100. A la dose antivégétative l'acidité est de 62 %, à la dose mortelle elle est de 25 %.

3° *La dose mortelle d'antiseptique est abaissée pour les microbes accoutumés.*

S'il faut, par exemple, 0 gr. 1 0/00 de bichlorure de mercure pour tuer le bacille lactique normal, il faut seulement 0 gr. 04 0/00 pour tuer le ferment accoutumé.

Le tableau suivant donne les valeurs comparatives pour les différents antiseptiques.

	Doses mortelles	
	Microbe normal	Microbe accoutumé
Arséniate de K.....	150 gr.	125 gr.
Phénol	9 gr.	6 gr.
Fluorure de sodium..	5 gr.	3 gr.
AzO ³ Ag	0 gr. 05	0 gr. 02
HgCl ²	0 gr. 1	0 gr. 04

Et nous avons remarqué que cette dose mortelle d'antiseptique était abaissée non seulement pour le toxique auquel le microbe était accoutumé, mais aussi pour tous les autres antiseptiques. Exemple : à des ferments lactiques accoutumés au bichlorure de mercure à 27 milligr. par litre, nous avons ajouté du fluorure de sodium à doses différentes et progressives. La dose mortelle n'a pas été égale à 5 gr. 0/00 comme elle l'est pour le ferment normal; il a suffi de 3 gr. 8 pour amener la mort.

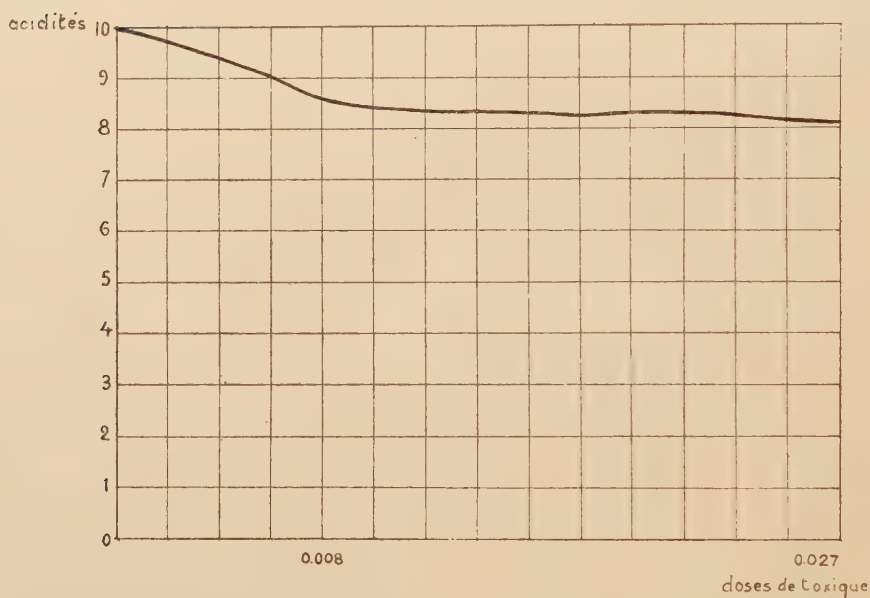
M. RICHET, pour expliquer l'abaissement de la dose mortelle d'antiseptique chez le microbe accoutumé, considère celui-ci comme un microbe intoxiqué ayant acquis une résistance seulement dans une certaine limite : ses réactions de défense seraient beaucoup plus faibles que celles du ferment normal.

Nous avons pensé interpréter ce fait d'une autre façon; le microbe accoutumé est imprégné, il est en quelque sorte saturé du poison. Il est possible alors qu'il suffise à ce moment d'une dose toxique inférieure à celle nécessaire dans les conditions normales pour amener sa mort immédiate.

VEGETATION DU MICROBE ACCOUTUME REMIS SUR MILIEU NORMAL

Voyons comment réagiront, par rapport au ferment normal, les bacilles accoutumés lorsqu'ils seront ramenés dans le milieu non additionné d'antiseptique.

Graphique XIII



Courbe comparative du rendement en acide lactique des souches accoutumées à HgCl_2 remises en milieu normal.

On constate, et tous les auteurs sont d'accord sur ce point, que dans ces conditions le rendement en acide lactique est inférieur à celui d'un bacille normal sur un milieu normal. Si le microbe normal sur milieu normal

donne 10 d'acidité, le microbe accoutumé à la dose antivégétative de HgCl^2 (0 gr. 008 0/00) ne donne plus que 8,7, et le microbe accoutumé à la dose maxima de HgCl^2 (0 gr. 027 0/00) ne fournit plus que 8,1.

Donc l'accroissement du ferment accoutumé ramené sur un milieu normal est en raison inverse de la dose de poison qu'il a supporté antérieurement.

DUREE DE L'ACCOUTUMANCE

Il est à prévoir que le bacille accoutumé, végétant sur un milieu normal, reprendra peu à peu ses propriétés primitives de microbe normal, c'est-à-dire perdra sa faculté de vivre en présence d'antiseptique. Cela sera réalisé lorsque la dose d'antiseptique antivégétative pour le milieu normal, sera également celle qui arrêtera toute fermentation pour le microbe accoutumé, remis dans les conditions normales. Nous concluerons alors, que celui-ci a repris complètement ses propriétés initiales (tableau suivant).

Les souches accoutumées depuis un an environ aux doses antivégétatives et maxima de nos antiseptiques sont réensemencées toutes les quarante-huit heures sur milieu normal. Après certains délais variables, elles sont remises en présence des doses respectives de toxiques auxquels elles ont été accoutumées.

Prenons tout d'abord le cas du bichlorure de mercure.

Premier dosage.

Souche normale cultivée sur milieu normal donne 11 cc. 4 d'acidité.

Souche accoutumée au HgCl_2 0,027 ‰, cultivée sur milieu HgCl_2 0,027, donne 3 cc. 9 d'acidité.

Souche accoutumée au HgCl_2 0,008 ‰, cultivée sur milieu HgCl_2 0,008, donne 6 cc. 5 d'acidité.

Deuxième dosage. — Après quatre passages des souches accoutumées sur milieu normal (durée huit jours) :

Souche normale cultivée sur milieu normal donne 12 cc. 4 d'acidité.

Souche accoutumée au HgCl_2 0,027 ‰, cultivée sur milieu HgCl_2 0,027, donne 2 cc. 3 d'acidité.

Souche accoutumée au HgCl_2 0,008 ‰, cultivée sur milieu HgCl_2 0,008, donne 5 cc. 3 d'acidité.

Troisième dosage. — Après dix passages des souches accoutumées sur milieu normal (durée vingt jours) :

Souche normale cultivée sur milieu normal donne 10 cc. 6 d'acidité.

Souche accoutumée au HgCl_2 0,027 ‰, cultivée sur milieu HgCl_2 0,027, donne 0 cc. 9 d'acidité.

Souche accoutumée au HgCl_2 0,008 ‰, cultivée sur milieu HgCl_2 0,008, donne 1 cc. 4 d'acidité.

Quatrième dosage. — Après vingt-deux passages des souches accoutumées sur milieu normal (durée quarante-cinq jours) :

Souche normale cultivée sur milieu normal donne 10 cc. 9 d'acidité.

Souche accoutumée au HgCl_2 0,027 ‰, cultivée sur milieu HgCl_2 0,027, donne 0 cc. 0 d'acidité.

Souche accoutumée au HgCl_2 0.008 %, cultivée sur milieu HgCl_2 0.008, donne 0 cc. 0 d'acidité.

Il ressort de ces faits qu'un temps assez court, quarante-cinq jours, et un nombre réduit de passages, 20 environ, sont suffisants pour faire perdre au microbe des propriétés acquises lentement.

Par conséquent, on ne peut pas dire que le phénomène d'accoutumance permette d'obtenir de nouvelles *racés* de microbes; on ne crée une race que lorsqu'on donne à des individus des caractères permanents.

REICHENBACH, dans une étude sur les bases théoriques de la désinfection, met parfois en évidence dans ces cultures des microbes plus résistants qui ne sont pas tués par l'action de l'antiseptique. Les germes qui ont survécu dans ces conditions ne forment pas par la suite une race héréditairement plus résistante. La modification qui s'est créée se perd dès la première culture et le caractère n'est pas fixé dans la descendance.

SINAI AKATSU et HIDAYO NOGUCHI, qui ont accoutumé des spirochètes aux composés arsénicaux, iodés et mercuriels, réfutent toute absence de caractères héréditaires dans les propriétés acquises.

Par contre, d'autres auteurs comme M. RICHET, M. CARDOT, M^{me} BACHRACH, BEYERINCK, GRASSBERGER, TËNISSEN, accordent une grande valeur à la variation physiologique créée dans les conditions de l'accoutumance et réussissent à former des races stables dans leur descendance.

L'état d'accoutumance n'est un état stable que lorsqu'on conserve les microbes dans le milieu auquel ils ont

été accoutumés. Alors, dans ces conditions seulement, les propriétés nouvelles acquises peuvent se conserver indéfiniment. Les souches accoutumées, que nous avons eues en notre possession pendant deux ans, étaient cultivées sur milieu contenant des antiseptiques aux doses antivégétatives et maxima. Elles ont été réensemencées environ tous les dix jours, et elles ont conservé les mêmes propriétés, le même pouvoir fermentatif qu'aux premiers temps de leur accoutumance (voir le tableau de la page 70).

Nous devons signaler que MM. RICHET, CARDOT et M^{lle} BACHRACH ne sont pas arrivés dans tous les cas à des résultats semblables : ils n'ont jamais obtenu d'accoutumance pour le bichlorure de mercure et ils envisagent pour certains autres antiseptiques le phénomène d'accoutumance de la façon suivante : pendant une première période, dont le temps varie avec la nature du toxique employé, l'accoutumance s'établit; pendant une deuxième période les microbes perdent lentement leur pouvoir de reproduction et meurent. A l'accoutumance du début succède une sensibilisation, sensibilisation qui serait de l'ordre des phénomènes anaphylactiques.

Nous allons rechercher, dans la deuxième partie de notre travail, s'il existe, chez les microbes, des manifestations comparables au phénomène de l'anaphylaxie.

L'ANAPHYLAXIE EXISTE-T-ELLE CHEZ LES MICROBES ?

HISTORIQUE

MM. Charles RICHEL, Henry CARDOT, M^{lle} BACHRACH, en cultivant pendant plusieurs mois des ferments lactiques sur un milieu contenant de très faibles doses d'azotate de thallium, ont constaté qu'en présence d'une dose élevée, mais non antivégétative de ce poison, les ferments poussaient moins bien que le ferment témoin normal dans les mêmes conditions. Le microbe, qui a subi un premier contact avec un antiseptique, a été rendu plus sensible à l'action seconde de ce même antiseptique. De même une souche, ayant acquis une accoutumance pour une dose assez forte d'un toxique donné, dépérit et meurt après plusieurs mois de réensemencements successifs sur ce milieu toxique. Dans ce cas encore, le microbe, par un contact prolongé, est sensibilisé au toxique employé. Ce serait, d'après ces auteurs, les deux modalités de l'anaphylaxie chez les microbes : anaphylaxie en rapport avec la dose de poison et anaphylaxie en rapport avec la durée d'intoxication.

SCHNABEL a réussi à produire chez les bactéries un

état d'hyper-sensibilité en les cultivant dans des solutions très diluées de substances toxiques. Il fait entrer deux facteurs à la base de ses recherches, le temps de culture et la concentration du poison. D'après lui, les solutions à concentration élevée produisent des cas de résistance très rapide accusés après quelques heures. Les solutions étendues amènent lentement l'état d'hyper-sensibilité. Mais le phénomène n'est pas spécifique, de sorte que des pneumocoques hypersensibles à l'optoquine le sont également à la quinine et au formol. Des staphylocoques hypersensibles au bichlorure de mercure, se montrent sensibles aussi à l'azotate d'argent.

ETUDE DE L'ANAPHYLAXIE CHEZ LES MICROBES

Nous tenterons de résumer succinctement les données qu'on peut admettre sur l'anaphylaxie en général, et telles qu'elles découlent des travaux de notre maître, M. A. LUMIÈRE.

L'état anaphylactique d'un animal est créé par l'imprégnation de son milieu intérieur par une substance étrangère à son organisme.

Cette substance est le plus souvent une protéine, un colloïde naturel, mais ce colloïde peut être à forme micellaire ou à forme moléculaire : l'ovalbumine qui n'est pas un colloïde granulaire est un des plus puissants sensibilisateurs pour les mammifères. De plus, les cristalloïdes peuvent aussi parfois créer l'état anaphylactique, exceptionnellement chez certains sujets seulement, et à un moment donné de leur existence. Les conditions de l'hyper-sensibilité dans ces cas nous échappent complè-

tement; tandis que l'état de sensibilité créé par certaines protéines, comme l'ovalbumine chez le cobaye, est un phénomène constant.

L'état d'anaphylaxie consiste dans une propriété nouvelle acquise à la suite de l'impregnation. Cette propriété chez les mammifères porte sur les liquides humoraux circulants ou interstitiels, qui acquièrent la faculté de précipiter les nouvelles quantités d'antigène que l'on vient à faire passer dans l'organisme des sujets sensibilisés.

La réaction anaphylactique est une réaction de flocculation. Les désordres constatés proviennent de la présence de substances insolubles qui prennent naissance dans le torrent circulatoire ou dans les tissus par réaction de l'antigène sur les liquides humoraux.

L'anaphylaxie peut aussi porter sur les cellules par le même mécanisme.

Si l'on injecte à un animal des cellules d'un autre animal — par exemple si l'on injecte à un cobaye des hématies de lapin — les protéines de ces hématies conféreront au plasma du cobaye la propriété de faire précipiter ou flocculer les protéines de ces mêmes hématies, comme l'ovalbumine confère aux liquides humoraux la faculté de précipiter cette même albumine quand elle est injectée en dose seconde à quelques semaines d'intervalle.

Dans tous les phénomènes anaphylactiques la modification qui caractérise le phénomène porte sur les humeurs, les liquides interstitiels et non sur les cellules.

La propriété des sérums hémolytiques ou cytolytiques tient aux sérums et non aux globules rouges et aux cellules. Dans ces derniers cas ce sont les protéines cellu-

laïres qui constituent l'antigène, au même titre que l'albumine d'œuf dans l'anaphylaxie par cette substance. L'albumine d'œuf ne change pas dans cette anaphylaxie.

On conçoit ainsi facilement l'anaphylaxie chez les métazoaires, mais par quel mécanisme s'opérerait-elle chez les protozoaires qui n'ont pas de liquides interstitiels ?

D'autre part, si les premiers travaux de A. LUMIÈRE et COUTURIER sur l'anaphylaxie des végétaux tendent à faire admettre que l'anaphylaxie serait possible chez les métaphytes, cette conclusion n'a pas été confirmée par d'autres auteurs (voir thèse de NOBÉCOURT) et il est possible que les résultats positifs obtenus par LUMIÈRE et COUTURIER soient dus à d'autres causes qu'à l'anaphylaxie.

D'ailleurs A. LUMIÈRE lui-même reconnaît aujourd'hui que la question n'est pas tranchée et que l'interprétation qu'il a donnée des faits est sujette à révision.

L'anaphylaxie chez les métaphytes pourrait encore se comprendre si elle était formellement établie parce que ces êtres ont des liquides interstitiels. Mais étant donné qu'elle est douteuse, on comprendrait moins encore l'anaphylaxie chez les protophytes, c'est-à-dire chez les microbes.

APPLICATION DE CES NOTIONS AU CAS PARTICULIER DES MICROBES

a) Pour que le microbe soit sensibilisé on est obligé d'admettre *que le poison traverse la membrane de la cellule bactérienne*. Ce fait, qui est généralement admis, est loin d'être démontré. Le protoplasma de la cellule est

formé par des granules micellaires et M. A. LUMIÈRE a mis en évidence l'immunité du granule micellaire contre les influences chimiques extérieures et les atteintes des agents étrangers.

Lorsqu'on essaie de colorer des cellules vivantes avec des substances colorantes par exemple, les cellules ne prennent la couleur qui *si les colorants employés sont toxiques*; si les substances sont inoffensives, les cellules restent incolores. Tant qu'elle est vivante la cellule est réfractaire à la coloration.

Les granules micellaires sont pourtant formés de substances protéiques dont les groupements COOH et NH ont des affinités chimiques pour les fonctions du colorant, mais les combinaisons ne peuvent se former que lorsque l'état colloïdal du protéique est détruit.

Si dans une culture de levure de bière, dont les éléments sont assez gros pour être examinés directement au microscope, on ajoute quelques gouttes de bleu de méthylène à 0,5 %, seules les cellules mortes s'imprègnent de la substance étrangère et se colorent en bleu. Les autres cellules vivantes restent incolores. C'est là un procédé utilisé en brasserie pour le contrôle des levains. M. A. LUMIÈRE a observé encore des manifestations identiques pour des paramoécies sur lesquelles ont été essayés 650 colorants. Cette expérience a été répétée par nous avec plus de 50 matières colorantes sur des ferments lactiques de cultures âgées de trois jours. Nous colorions seulement les amas de bacilles morts.

Dans ces conditions, il est difficile d'affirmer que le poison puisse pénétrer dans la cellule microbienne; peut-être pourrait-on être fixé en calculant la quantité de to-

xique qui a été absorbée par les microbes, par différence entre le poids du toxique dans le milieu avant toute culture et celui de ce toxique après fermentation. Mais les doses de la substance étrangère additionnée, au bouillon étant assez faibles, soit, par exemple, pour le bichlorure de mercure 0 gr. 008 par litre, les réactions chimiques de différenciation ne peuvent déceler avec précision des variations de l'ordre de fraction d'un milligramme.

b) *Le choix de la substance sensibilisatrice peut aussi être discuté.* Au lieu d'un colloïde, RICHER et ses élèves emploient des cristalloïdes qui ne sont qu'exceptionnellement des substances sensibilisatrices. Cependant cela n'est pas une objection qui a une valeur absolue. Nous ne devons pas oublier que les microbes vivent très facilement et fort bien sur des milieux synthétiques constitués par des substances minérales ou cristalloïdes, desquelles ils retirent tous les matériaux nécessaires à la fabrication de leurs albumines. Il se pourrait alors fort bien qu'ils puissent être anaphylactisés par ces substances minérales, mais il convenait toutefois de s'adresser premièrement aux colloïdes pour obtenir une sensibilisation et affirmer l'anaphylaxie.

c) Il faut tenir compte aussi de la durée de *la période d'incubation*.

Si l'on fait passer directement un microbe d'un milieu à concentration toxique faible dans un milieu à concentration toxique forte, il n'y a aucune période d'incubation avec temps d'arrêt comme dans le cas de l'anaphylaxie chez les animaux; pour se placer dans des conditions analogues à celles de l'anaphylaxie animale, il faudrait faire

séjourner les microbes dans un milieu intermédiaire qui ne contiendrait pas de substance toxique.

d) *Le choc, lui aussi, devrait être immédiat.* Il semblerait, alors qu'il suffit de deux à trois minutes pour tuer un cobaye par injection déchainante, que la culture dût être stérilisée immédiatement. L'atténuation progressive des cultures amenant la mort après un délai de quelques jours ne peut pas être assimilée au véritable choc.

Pour toutes les raisons que nous venons d'exposer, nous avons cru utile de reprendre cette question en apportant des modifications dans ses moyens d'étude. Nous envisagerons en premier lieu la possibilité de l'anaphylaxie chez les microbes mis anormalement en contact avec un cristalloïde et, dans ce cas, nous choisirons des substances inactives vis-à-vis des sels du milieu de culture. En second lieu, nous utiliserons des colloïdes; nous pourrions seulement alors conclure à l'existence ou à la non-existence de l'anaphylaxie vraie.

EXPERIENCES

a) Nous avons voulu faire des expériences analogues à celles de MM. RICHET, CARDOT et M^{re} BACHRACH, mais lorsque nous avons voulu ajouter du nitrate de thallium à notre milieu habituel, nous avons obtenu une précipitation, le nitrate de thallium formant, avec le chlorure de sodium de nos bouillons, du chlorure de thallium qui précipitait sous forme de fins cristaux restant en suspension dans le liquide. C'est pour cela que nos essais ont porté sur des cristalloïdes différents.

b) *Durée d'intoxication et anaphylaxie.*

Nous possédons au laboratoire des séries de souches accoutumées à diverses doses d'antiseptiques, chez lesquelles, pendant près de deux années, nous n'avons pas constaté de sensibilisation ou de diminution de vitalité amenant progressivement la mort. Sans nous arrêter à cette constatation, nous indiquerons les chiffres des dosages effectués dans les premiers temps d'accoutumance et les chiffres des dosages effectués quelques mois après.

Nous relèverons seulement ceux relatifs au bichlorure de mercure qui a été considéré par nombre d'auteurs comme un antiseptique irrégulier et sensibilisant.

	Acidités
Souche accoutumée à HgCl^2 à 0 gr. 008 ‰ :	—
3 février 1925	5,5
15 février 1925	5,6
5 mars 1925	5,5
14 avril 1925	6,1
29 avril 1925	6,1
20 mai 1925	5,6
28 mai 1925	7,4
14 juin 1925	6,9
21 mars 1926	6,8
5 mars 1926	7,1
17 avril 1926	7,3

A la lecture de ces dosages on est obligé de conclure qu'une longue durée d'intoxication ne confère pas d'hyper-sensibilité au microbe. Voyons maintenant si un court passage dans un milieu toxique peut conférer l'hyper-sensibilité à un organisme.

Nous avons employé pour cette expérience l'arséniate

neutre de potasse et le bichlorure de mercure. Les microbes ont subi un contact de vingt-quatre heures avec ces toxiques employés à doses différentes (pour l'arséniate, 1-10-20 gr. 0/00; pour le bichlorure, 0 gr. 0005-0,001-0,002 0/00).

Nous avons ensuite pratiqué trois réensemencements successifs sur milieu normal; nous pouvions alors admettre que les cellules avaient éliminé le poison de leur protoplasma; nous les remettions à ce moment sur la dose dont ils avaient subi l'imprégnation. Nous résu-
mons, dans le tableau ci-dessous, les résultats obtenus.

Arséniate à 1 %o. — Souche normale : 8,4; souche ayant subi un contact de 24 heures : 8,5.

Arséniate à 10 %o. — Souche normale : 7,3; souche ayant subi un contact de 24 heures : 7,1.

Arséniate à 20 %o. — Souche normale : 5,1; souche ayant subi un contact de 24 heures : 5,3.

Bichlorure de mercure à 0,0005. — Souche normale : 4; souche ayant subi un contact de 24 heures : 4,1.

Bichlorure de mercure à 0,001. — Souche normale : 4,1; souche ayant subi un contact de 24 heures : 4,3.

Bichlorure de mercure à 0,002. — Souche normale : 2,4; souche ayant subi un contact de 24 heures : 2,4.

Le microbe n'a pas été gêné dans son activité fermentative par un premier passage sur milieu toxique, l'acidité fournie par le ferment traité égale celle que développe le ferment normal.

c) *Anaphylaxie en rapport avec la dose de poison.*

Pendant quatre mois nous avons conservé, en les réensemencant tous les trois jours, des ferments lactiques ac-

coutumés à une substance toxique : substance à titres différents pour chaque tube, mais toujours inférieurs à la dose antivégétative. Ce délai terminé, nous avonsensemencé toutes ces souches sur le milieu contenant la dose antivégétative. Allions-nous enregistrer l'accoutumance pour les microbes cultivés sur les fortes doses antiseptiques et l'anaphylaxie pour ceux cultivés sur de faibles doses ? Nous avons opéré avec un antiseptique faible, l'arséniate de potasse neutre, un antiseptique fort, le bichlorure de mercure, et, comme contrôle, l'azotate de thallium, substance utilisée par nos devanciers.

I. — Prenons, en premier lieu, le cas du bichlorure de mercure. Des microbes ayant végété respectivement sur 0 gr. 0005 0/00 (souche A), 0 gr. 001 0/00 (souche B), et 0 gr. 004 0/00 (souche C) sont ensemencés sur milieu à 0 gr. 008 0/00 (dose antivégétative). Après quarante-huit heures de culture sur ce milieu, nous obtenons les acidités suivantes :

	Doses de poison par litre	Acidités
Souche normale	00	0
— — A	0 gr. 0 05	0,4
— — B	0 gr. 001	1,6
— — C	0 gr. 004	2,9
Microbe normal sur milieu normal	»	8,4

Les acidités obtenues sont proportionnelles à la dose de poison et la proportion demeure la même, qu'il s'agisse d'une accoutumance à une faible dose ou d'une accoutumance à des doses massives.

II. — Résultats enregistrés avec l'arséniate de potasse neutre dans les mêmes conditions : l'expérience a été plus complète, elle a porté sur une échelle de doses plus

étendues, allant de 0 gr. 1 à 40 gr. 0/00 : 0 gr. 1 0/00, souche A; 1 gr. 0/00, souche B; 10 gr. 0/00, souche C; 20 gr. 0/00, souche D; 40 gr. 0/00, souche E.

Mises à végéter sur 45 gr. 0/00, ces souches ont fourni les acidités suivantes après vingt-quatre heures d'étuve :

Souche normale		00	—
—	— A	0,1	0,2
—	— B	1	0,4
—	— C	10	2,2
—	— D	20	4,9
—	— E	40	5,7

III. — Résultats enregistrés avec l'azotate de thallium : 0 gr. 01 0/00, souche A; 0 gr. 1 0/00, souche B; 1 gr. 0/00, souche C.

L'ensemencement d'épreuve se fait sur milieu à 2 gr. 0/0. Dans ces conditions, nous savons que ce n'est plus du nitrate de thallium qui se trouve dans le bouillon de culture, mais du chlorure. Les souches accoutumées se comporteront comme une souche normale :

Souche normale		00	8,2
—	— A	0,01‰	8,1
—	— B	0,1 ‰	8,4
—	— C	1 ‰	8,4

La conclusion se dégage elle-même de cet ensemble de chiffres. Nous ne voyons rien qui nous autorise à parler de la sensibilisation du microbe. Lorsque après l'accoutumance à une faible dose de toxique, nous plaçons le microbe sur un milieu contenant des doses supérieures de toxique, il y a une progression de l'acidité formée en rapport avec la dose à laquelle le microbe était accou-

tumé. En partant d'une acidité nulle fournie par la souche normale, végétant mal ou pas du tout sur le milieu plus concentré en poison, nous arrivons progressivement à une plus forte acidité développée par la souche accoutumée à la plus forte dose. Le phénomène représenté par un graphique, donnerait une droite continue.

Pourrons-nous encore parler de poisons cristalloïdes sensibilisants ? Nous pensons qu'il existe des corps toxiques à doses plus ou moins forte et que le microorganisme répond à l'action du poison suivant une loi générale très simple : diminution de la vitalité en fonction de la dose, et cela quelles que soient les conditions antérieures qui ont pu agir sur les microbes. Chez le ferment lactique, tout au moins, il nous semble que les cristalloïdes soient incapables de déclencher les phénomènes d'anaphylaxie. Nous concluerons que les microbes, mis anormalement en présence d'un cristalloïde étranger, se comportent suivant les lois établies pour l'accoutumance, lorsqu'on les sort de ce milieu pour les transporter immédiatement dans un milieu contenant le même cristalloïde à une concentration plus forte.

SENSIBILISATION DES FERMENTS LACTIQUES PAR DES COLLOÏDES

Malgré les expériences précédentes négatives, on ne peut pas encore nier l'existence de l'anaphylaxie chez les microbes. Il nous restait encore à essayer la sensibilisation par les colloïdes.

Nous avons choisi, à cet effet, des colloïdes de différentes natures. Un colloïde animal, le blanc d'œuf, et des

colloïdes d'origine microbienne, endotoxines et exotoxines. Ce choix nous a semblé logique, car il ne faut pas oublier que les animaux se sensibilisent facilement vis-à-vis des colloïdes d'origine animale, et moins bien vis-à-vis des colloïdes d'origine végétale. Il pourrait donc arriver qu'un microbe quelconque, ferment lactique ou staphylocoque ou coli, n'acquiert pas l'état anaphylactique pour le blanc d'œuf, mais soit rendu, après un premier contact hyper-sensible, à l'action d'un colloïde de son espèce, une toxine microbienne en particulier.

Nous opérons en ajoutant dans le bouillon de culture une solution de blanc d'œuf, 0 gr. 001 par litre de milieu. Le ferment lactique pullule très bien sur ce nouveau milieu. Il manifeste une activité semblable à celle qu'il développe sur le milieu normal. Après seize heures d'étuve, dix gouttes de la culture obtenue sont ensemencées dans un ballon contenant alors 0 gr. 01 de blanc d'œuf par litre de bouillon. Un ballon témoin reçoit le ferment normal (10 gouttes d'une culture de même acidité). Dans ces conditions, les résultats obtenus après vingt-quatre heures sont respectivement pour chacun des ballons 7 cc. 9 et 7 cc. 7. Dans cette expérience, l'activité fermentative du microbe préalablement traité est mesurée par un chiffre supérieur à celui fourni par le microbe normal. Dans d'autres expériences nous avons enregistré les dosages suivants :

Ferment normal	Ferment traité
8,4	8,1
8,4	8,5
7,6	7,6
8,1	8,3

Nous n'avons pas noté une hyper-sensibilité du ferment lactique vis-à-vis du blanc d'œuf.

Nous avons conduit, avec la même technique, nos essais de sensibilisation par les toxines.

Les toxines tétaniques, botuliniques, diphtériques nous ont été fournies par l'Institut Pasteur de Paris.

Nous résumerons notre moyen de préparation des endotoxines microbiennes. Sur gélose en boîtes de Roux, nous cultivons le microbe dont nous voulons extraire le contenu cellulaire. Nous portons à l'étuve pendant quatre jours. Les microbes sont recueillis par l'addition, dans chaque boîte, de 5 cc. de sérum physiologique, lavés ensuite et ramassés par centrifugation. A ce moment nous ajoutons 5 cc. de soude à 10 %, nous laissons en contact pendant vingt-quatre heures. Il nous suffit ensuite de ramener au volume primitif et de neutraliser à l'aide d'une solution d'HCl. Nous avons préparé par ce moyen l'endotoxine du bacille du charbon, du colibacille, et du bacille de Koch.

Chaque tube de culture était additionné, avant tout traitement, de un millième de cc. de la toxine déterminée. La première culture d'un microbe n'est pas gênée par la présence de la substance étrangère, elle estensemencée dans des tubes renfermant 1/100^e de cc. de la même toxine. Les résultats obtenus rappellent ceux des expériences sur la sensibilisation par l'albumine du blanc d'œuf. Ils sont négatifs dans le sens de l'anaphylaxie.

Nous avons fait varier les conditions. Au lieu de faire pulluler les microbes sur le milieu sensibilisateur, nous nous adressons à des cultures de vingt-quatre heures

en milieu normal, contenant déjà un nombre très élevé d'individus et nous ajoutons la substance sensibilisatrice. Dans ce cas nous réalisons le maximum de conditions essentielles pour créer l'état anaphylactique : addition de substances colloïdes, même temps de contact de tous les microbes avec le produit anaphylactogène (dans les expériences précédentes, les microbes âgés demeurent vingt-quatre heures en présence du corps sensibilisateur, alors que les jeunes peuvent rester parfois une heure et même moins), période d'incubation en passant par l'intermédiaire d'un milieu normal. L'injection déchainante sera représentée par l'addition brusque dans la culture d'une deuxième dose de la même toxine.

A des tubes de cultures de vingt-quatre heures de ferment lactique sur milieu normal, nous ajoutons un nombre de gouttes variable et croissant (1 à 10) de toxines tétaniques, diphtériques, botuliniques diluées au millième. Nous portons à l'étuve certains tubes pendant vingt-quatre heures, d'autres quarante-huit heures ou trois jours, ou huit jours. Nous faisons ainsi varier la durée du séjour dans le liquide sensibilisant. Au sortir de l'étuve, tous les tubes reçoivent $1/10^e$ de centimètre cube de la toxine pure. Les microbes ne sont pas tués ni rendus plus sensibles car ils conservent la faculté de se reproduire en milieu normal avec une intensité équivalente à celle du ferment témoin. Lesensemencements d'épreuve sont faits immédiatement et après six heures, vingt-quatre heures, quarante-huit heures et trois jours; dans tous les cas ils ont donné une culture abondante. Le microbe n'était pas tué et pouvait végéter comme un microbe normal.

Nous reprenons ces essais en interposant une période d'incubation par des passages sur milieu normal. Les résultats restent identiques.

Tous ces essais, avec toutes leurs variantes, nous ont montré que nous n'obtenons pas l'état anaphylactique chez le ferment lactique. Il nous restait à changer la nature du microbe, nous nous sommes adressés à d'autres espèces : staphylocoques *B. coli* et *B. charbonneuse*. Pour chacun nous avons constaté qu'un premier contact avec une faible dose d'un colloïde, suivi ou non suivi d'un passage sur milieu intermédiaire, n'avait pas d'influence sur la façon dont se comporte le microbe remis une seconde fois en présence de ce colloïde, et nous observons les mêmes faits, que nous expérimentions avec une toxine quelconque et différente, ou que nous employions la toxine spécifique du microbe. Un staphylocoque qui a été en contact avec les produits endo ou exo bacillaires d'une culture de staphylocoques, ou de tout autre microbe, n'est pas tué ni rendu plus sensible qu'un témoin à une deuxième action des mêmes produits. Un bacille diphtérique n'est pas sensibilisé par sa toxine ni par toute autre toxine.

CONCLUSIONS

De l'ensemble de nos recherches nous dégagerons les conclusions suivantes :

1° Par augmentation progressive de la dose de poison ajouté à leur milieu et par des repiquages successifs il est possible de faire vivre les cellules microbiennes sur des milieux primitivement antivégétatifs.

2° Pour un microbe donné et pour un toxique donné il existe une dose toxique limite d'accoutumance, bien déterminée, qui peut toujours être atteinte et jamais dépassée.

3° Le ferment qui a servi à nos expériences s'est accoutumé à tous les antiseptiques que nous avons essayés (8).

4° L'accoutumance ne peut s'établir qu'au bout d'un certain temps et la marche du phénomène est toujours progressive et régulière.

Nous n'avons jamais observé de « mutations brusques » au cours de nos expériences.

5° Vis-à-vis d'un antiseptique différent, la cellule adaptée à un antiseptique donné se montre semblable à une cellule normale. L'accoutumance est spécifique.

6° L'accoutumance peut s'établir pour l'action combinée de plusieurs toxiques à la condition toutefois que ces toxiques ne forment pas entre eux de combinaisons chimiques.

7° Les microbes accoutumés acquièrent de ce fait des propriétés nouvelles : pouvoir de fermentation augmenté par rapport au microbe normal; pouvoir de prolifération s'abaissant à mesure que s'élève la dose de poison accoutumant. La dose mortelle est plus faible pour le microbe accoutumé que pour le microbe normal.

8° Les caractères dérivant de l'accoutumance se perdent rapidement. Il suffit de quelques passages sur milieu normal pour que la cellule retrouve son fonctionnement primitif.

9° L'état d'accoutumance est stable tant que les faits qui le conditionnent ne varient pas; nous avons pu conserver pendant deux ans des souches de ferments lactiques accoutumés qui ont gardé toutes leurs propriétés.

10° Nous n'avons jamais trouvé dans nos cultures une sensibilisation des microbes vis-à-vis d'un toxique, quels que soient sa nature, son temps d'action et sa dose.

BIBLIOGRAPHIE

- SEINAI AKATSU et HIDEYO NOGUCHI. — The drug-fastness of spirochetes, to arsenic mercurial and iodine compounds in vitro. *Journal of exper. méd.*, t. XXV, mars 1917, p. 349.
- Eudoxie BACHRACH. — Variations biologiques d'un organisme monocellulaire. Accoutumance et anaphylaxie chez le bacille lactique. *Thèse Paris* 1924.
- E. BACHRACH. — Les phénomènes de sensibilisation (anaphylaxie) chez les microbes. *Arch. Intern. de Phys.*, 28 mai. 1926.
- E. BACHRACH et H. CARDOT. — Modifications du bacille lactique sous l'influence du milieu. *Arch. Intern. de Phys.*, 28 mai. 1926.
- BAERTHELM. — Ueber mutationserscheinungen bei bakterien. *Arch. a. d. Kais-Gesundh.*, t. XI, f. 4 sept. 1912, p. 433.
- W. BEYERINCK. — Ueber das intratferment und über physiologische artbildung. *Folia microbiologica*, t. III, dec. 1924.
- BEYERINCK. — Variabiliteit bij bac. prodigiosus. *Koninkl Acad. v. Wetenschappen*, 29 janv. 1910.
- BOTEZ (M.-A.). — Adaptation microbienne par variation et sélection. *Soc. de Biologie*, LXXXVII.
- CARDOT (H.). — Sur les irrégularités des ferments lactiques. *Ann. I. P.*, XXXVIII, 1923.

- CARDOT (C. et H.). — Analogie entre les ferments lactiques et les streptocoques au point de vue de l'action des antiseptiques. *C. R. Ac. Sc.*, 272, 1917.
- CARDOT (H.) et LAUGIER (H.). — Action des fortes concentrations salines sur le bacille lactique. *Soc. de Biologie*. LXXXVI, 108, 1922.
- Modifications du bacille lactique sous l'influence des fortes concentrations salines. *J. ph. et path. gén.*, XXI, 54-69, 1923.
- Adaptation, transmission des caractères acquis, sélection par concurrence vitale chez le ferment lactique. *C. R. Ac. Sc.*, CLXXVI, 1087, 1923.
- Contribution à l'étude de l'accoutumance et de la sélection chez les microbes. *An. phys. et phys.-chimie biol.*
- Contribution à l'étude de l'accoutumance. De la sélection et de la transmission des caractères acquis chez les microbes. Gaston DOIN, Paris.
- CARDOT (H.) et RICHET (Ch.). — Héritéité, accoutumance et variabilité dans la fermentation lactique. *An. I. P.*, XXXIII, 575-615, 1919.
- CHASSEVANT (A.). — Action des sels métalliques sur la fermentation lactique. *Thèse Fac. Méd. Paris*, 1897, et *Trav. lab. Charles Richet*, VI, 264-297, 1898.
- S. DA CONCEICAÕ (Quintino). — Algas palavras sobre sensibilisação de bactérias. *Trabalhos do Lab de Analyse clin.*, t. II, fas. 123, 1905, pp. 79-129.
- DAKIN (H.-D.). — Manuel des antiseptiques. VIGOT frères, éditeurs, 1918.
- DANIEL-FRANK. — Adaptation des paramoécies à l'eau distillée. *Amér. Journ. physiol.*, XXIII, pp. 49-63, 1908, *B. I.*, 1911, p. 116.
- DIENERT. — Sur la fermentation de la galactose et l'accoutumance des levures à ce sucre. *Ann. Inst. Pasteur*, XIV, 1900, et *C. R. Ac. Sc.*, CXXVIII, 569, 1899.

- DUTHOIT (A.). — De l'action sur différents microbes du chlorure de sodium à 9 p. 1.000. *Soc. de Biologie*, LXXXIX, 550, 1923.
- De l'action sur différents microbes du chlorure de sodium, seul ou associé à d'autres sels. *Soc. de Biologie*, LXXXIX, 553, 1923.
- EFFRONT (J.). — Action des acides minéraux sur le ferment lactique et le ferment butyrique. *Bull. Soc. Chim.*, 3^e série, IV, 337-339, 1890.
- Influence de l'acide fluorhydrique et des fluorures sur l'activité de la levure. *Bull. Soc. Chim.*, 3^e série, V, 476, 1891.
- Influence des fluorures sur l'accroissement de la levure. *Ibid.*, V, 731-734, 1891.
- L'influence de l'acide fluorhydrique et des fluorures sur les levures de bière. *C. R. Ac. Sc.*, CXVIII, 1894.
- L'acclimatation de la levure de bière à l'arsenic. *Soc. de Biologie*, LXXXIII, 806, 1920.
- Sur le mécanisme de l'acclimatation des microorganismes aux substances toxiques. *Soc. de Biologie*, LXXXIII, 807, 1920.
- EULER (H.-V.), I. LAURIN et PETERSON (A.). — Adaptation d'une levure haute au galactose. T. 114, p. 276, 2, 1921, *Biochem. Zeit.*
- FABRY (Paul). — Modifications biologiques du B. coli en milieux phéniqués. *Soc. de Biologie*, LXXXV, 884, 1921.
- J. FRANTZ-DANIEL. — Adaptation and immunity of lower organisms to ethyl alcohol. *Journ. of exp. Zool.*, t. VI, 1909, p. 571-1611.
- FULMER (E.-J.). — The acclimatation of yeast to ammonium fluoride and its reversion in wort. *Journ. physical Chem.*, XXV, 455, 1921.
- Mutations brusques chez les ferments lactiques par divergences individuelles. *C. R. Ac. Sc.*, CLXXII, 1382, 1921.

- GRASSBERGER (R.). — Ueber anpassung und vererbung bei bakterien. *Arch. f. hyg.*, LIII, f. 2, p. 158, 1905.
- GORINI (C.). — Mutations physiologiques brusques chez les ferments lactiques par divergences individuelles. *C. R. Acad. Sc.*, t. CLXXII, 30 mai 1924, p. 1382. *B. I.*, 1924, p. 734.
- GUNN (J.-A.). — Cellular immunity : congenital and acquired tolerance to non-protein substances. *Physiological Reviews*, III, 41-74, 1923.
- HAFKINE (W.-M.). — Recherches sur l'adaptation au milieu chez les infusoires et les bactéries. Contribution à l'étude de l'immunité. *Ann. Inst. Pasteur*, IV, 363-379, 1890.
- JOACHIMOGLU (G.). — Sur l'action du sublimé, du phénol et de la quinine sur la levure. *Biochem. Zeit.*, t. 130, p. 239-248, 1922.
- KARWACKI (Léon) et BIERNAKI (Stanislas). — Action *in vitro* de quelques substances chimiques sur le développement des bacilles tuberculeux. *Ann. I. P.*, mai 1925.
- KOSSIAKOFF. — De la propriété que possèdent les microbes de s'accoutumer aux milieux antiseptiques. *Ann. Inst. Pasteur*, I, 1887.
- KOWALENKO (Berne). — Studien über sogenamt mutation serscheinungen bakterien unter besonderer berücksichtigung der einzellenkultur. *Zeit f. Hyg.*, t. LXVI, f. 2, 27 juill. 1910, p. 227. *B. I.*, 1910, p. 262.
- LASSABLIÈRE (F.) et RICHTER (Ch.). — Action du sulfure de calcium phosphorescent sur la fermentation lactique. *Trav. du lab. Charles Richet*, VI, 19-73, 1909.
- LAVERAN (A.). — Sur les variétés acentsomiques artificielles des trypanosomes. *C. R. Acad. Sc.*, t. CLXVIII, 14 avril 1919, p. 749. *B. I.*, 1919, p. 481.
- LEVADITI (C.) et EWORT (C.). — Mécanisme de la création des variétés de trypanosomes toxo-résistants. *Soc. de Biologie*, LXX, 1.024, 1911.
- Considérations biologiques sur la toxo-résistance des trypanosomes. *Ibid.*, LXX, 127, 1911.

- LOEB (Jacques). — Ueber die anpassung von Fundulus an höhere konzentrationen. *Biochem. Zeitschr.*, t. XIII, pp. 391-405, 7, 1913, *B. I.*, 1915, p. 456.
- LUMIÈRE (Auguste). — Contribution à l'étude de la fermentation lactique et des propriétés des microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, XXXVII, 967-987, 1923.
- Sur la régularité de la fermentation lactique. *Ann. Inst. Pasteur*, XXXVII, 997-999, 1923.
- A propos des irrégularités de la fermentation lactique en présence de certains antiseptiques. *C. R. Ac. Sc.*, XXVIII, 258, 1924.
- Sur la variabilité de la fermentation lactique. *Ann. Inst. Pasteur*, XXXVIII, 344-357, 1924.
- MASSINI (Rudolf). — Ueber einen in biologischer Beziehung. *Arch. f. Hyg.*, t. LXI, f. 3, p. 250.
- MEONIL (F.) et BRISMONT (E.). — Sur les propriétés de races de trypanosomes résistantes à l'atoxyl et aux sérums. *Soc. de Biologie*, LXIV, 637, 1908.
- MEYER (H.). — Ueber das Milchsäureferment und sein Verhalten gegen Antiseptica. *Dorpo*. 1880.
- MITCHELL (Charlotte) et RICHET (Charles). — De l'accoutumance des ferments aux milieux toxiques. *Soc. de biologie*, LII, 637-639, 1900.
- MORGENROTH. — Zur kenntnis der arzneifestigkeit. *Tagung d. Deutsch Vereinigung für Mikrobiol in Centralbl. f. Bakt.*, I, t. LXXXIV, p. 110, 1922 supplément, *B. I.* 1923, p. 787.
- RAHN (Otto). — Die empfindlichkeit der Faubüis und milchsaurebakterien gegen gifte. *Centralbl. f. Bakter.* II, t. XIV, 18 janv. 1925, pp. 21-25.
- RAY (J.). — Variations des champignons inférieurs sous l'influence du milieu. *Revue Gén. Botan.*, IX, 1897, et thèse sc. Paris, 68 p., 1897.
- REGENSTEIN (Hans). — Studien über die anpassung von bakterien an desinfektionsmittel. *Centralbl. f. Bakt.* I, Vrig 1912, t. LXIII, f. 2-3, pp. 281-297.

REICHENBACH (Gottlinger). — Die theoretischen grundlagen der Desinfektion. *Centralblatt. f. Bakt.*, 24 oct. 1922, p. 15 à 28.

REVICI (Em.). — Sur la culture de la bactériidie charbonneuse dans des milieux à l'arsenic. *Soc. de Biologie*, LXXXVII, 737, 1922.

— Sur les modifications morphologiques de la bactériidie charbonneuse cultivée dans les milieux à l'arsenic. *Soc. de Biologie*, LXXXVII, 736, 1922.

RICHET (Charles). — De l'action de quelques sels métalliques sur la fermentation lactique. *C. R. Ac. Sc.*, CXIV, 1494, 1892.

— Action physiologique comparée des métaux alcalins. *Trav. laboratoire Ch. Richet*, II, 398-493, ALCAN, 1893.

— Des doses accélérantes des sels de magnésium dans la fermentation lactique. *Soc. de Biologie*, LIV, 1436, 1902.

— De la loi biologique qui gouverne la toxicité des corps simples. *Soc. de Biologie*, LXIX, 433-435, et *Trav. laboratoire Ch. Richet*, VII, 248-265, ALCAN, 1917.

— Etudes sur la fermentation lactique; II. Effets de la fluorescence sur la fermentation lactique. *Soc. de Biologie*, LVI, 219-224, 1904.

— De l'action de doses minuscules de substances sur la fermentation lactique. *Arch. Intern. Physiol.*, III, 203-217, 1905, et *Soc. de Biologie*, LVIII, 981, 1905.

— De l'action de doses minuscules de substances sur la fermentation lactique. Action du chlorure de baryum. *Arch. Intern. Physiol.*, III, 264-281, 1905.

— De l'action de doses minuscules de substances sur la fermentation lactique. *Trav. laboratoire Ch. Richet*, VI, 294-372, 1909.

— L'accoutumance du ferment lactique aux poisons (bromure de potassium). Etude de mésologie. *Rev. Gén. Botan.*, XXV bis, 583-590, 1914.

RICHET (Charles). — L'accoutumance héréditaire aux toxiques dans les organismes inférieurs (ferment lactique). *C. R. Ac. Sc.*, CLVIII, 764, 1914, et *Trav. laboratoire Ch. Richet*. VII, 443-450, 1917.

— Adaptation des microbes (ferment lactique) au milieu. *Ann. Inst. Pasteur*, XXIX, 22-55, 1915.

— De l'emploi alternant des antiseptiques. *C. R. Ac. Sc.*, CLXIII, 589, 1916.

— La fermentation lactique et les sels de thallium. Etude sur l'hérédité. *Ann. Inst. Pasteur*, XXXI, 51-60, 1917.

— De la physiologie générale cellulaire étudiée par la fermentation lactique. *Arch. Intern. Physiol.*, XVIII, 13 p., 1921.

— Antiseptiques réguliers et irréguliers. *C. R. Ac. Sc.*, CLXXVII, 1262, 1923.

RICHET (Charles), BACHRACH (Eudoxie) et CARDOT (Henry). — Les phénomènes d'anaphylaxie chez les microbes. *C. R. Ac. Sc.*, CLXXII, 512, 1921.

— Les alternances entre l'accoutumance et l'anaphylaxie (études sur le ferment lactique). *C. R. Ac. Sc.*, CLXXII, 1554, 1921.

— L'accoutumance du ferment lactique aux poisons (spécificité simultanée et alternance). *C. R. Ac. Sc.*, CLXXIV, 345, 1922.

— Etudes sur la fermentation lactique. Le souvenir chez les microbes. *C. R. Ac. Sc.*, CLXXIV, 842, 1922.

— De la simultanéité de deux effets toxiques contradictoires (accoutumance et anaphylaxie) sur la même cellule. *C. R. Ac. Sc.*, CLXXVIII, 535, 1924.

RICHET (Charles) et CARDOT (Henry). — Les antiseptiques réguliers et irréguliers. *C. R. Ac. Sc.*, CLXV, 491, 1917.

— De l'action des mélanges de quelques sels sur la fermentation lactique. *Soc. de Biologie*, LXXXI, 751, 1918.

- RICHET (Charles), CARDOT (Henry) et BACHRACH (Eudoxie). — Accoutumance et sélection du ferment lactique dans les milieux toxiques. *Journ. Phys. et Path. géné.* XVIII, 466-479, 1921.
- RICHET (Charles), CARDOT (Henry) et LE ROLLAND (Paul). — Les antiseptiques réguliers et irréguliers. *C. R. Ac. Sc.*, CLXIV, 669, 1917.
- RICHET (Charles) et LE BER (A.-G.). — Etudes sur la fermentation lactique. Action à très faibles doses de substances en apparence inoffensives. *C. R. Ac. Sc.*, CLXXV, 1020, 1922.
- SCHNABEL. — Ueber empfindlichkeitsversuche an bakterien an Tagung d. Deutsch. Vereinigung f. mikrobiologie in centralbl. f. Bakt., I, t. LXXX(X), p. 111, 1922 supplément. B. I., 1923, p. 788.
- THAYSEN (C.). — Funktionelle anpassungen bei Bakterien. *Centralbl. f. Bakter.*, I, orig. 1913, t. LXVIII, p. 1-35.
- TOENNIESSEN (E.). — Ueber die variationsformen der bakterien und ihre uerber einstiennung int den variationsformen der metazoen. *Centralbl. f. Bakt.*, I, t. 86, 1921, p. 353.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	9
HISTORIQUE	13
I. MÉTHODES	19
II. Action de divers toxiques sur la végétation du ferment lactique	33
III. Conditions de l'accoutumance à un toxique donné..	39
IV. Spécificité de l'accoutumance	55
V. Accoutumance simultanée à plusieurs poisons	57
VI. Propriétés des microbes accoutumés	65
VII. L'anaphylaxie existe-t-elle chez les microbes ?	73
VIII. CONCLUSION	89
IX. BIBLIOGRAPHIE	91

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

1° Les maladies à virus filtrant chez les plantes.

2° Les rudistes.

Lu et approuvé :

Le Doyen,

Ch. DEPÉRET.

Les Membres du Jury,

MM. H. CARDOT.

J. BEAUVÉRIE.

F. ROMAN.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 8 Novembre 1927.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
GHEUSI.

